UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1962 N° 202

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROPIONIBACTERIUM

Caractères Bactériologiques et Physiologiques

THESE

pour le Doctorat de l'Université

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JEAN-MICHEL BOYER

MEMBRES DU JURY

MM. BOUISSET, *Président.*
BOURBON
ROUX *Assesseurs*
BREUILLAUD
PITET, *Suppléant.*

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE

1962

Contribution à l'Etude

des

PROPIONIBACTERIUM

Caractères Bactériologiques et Physiologiques

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0094

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1962 N° 202

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DES

PROPIONIBACTERIUM

Caractères Bactériologiques et Physiologiques

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THESE

pour le Doctorat de l'Université

(Mention Pharmacie)

Présentée et soutenue publiquement en Juin 1962

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JEAN-MICHEL BOYER

MEMBRES DU JURY

MM. BOUISSET, *Président.*
BOURBON
ROUX
BREUILLAUD
PITET, *Suppléant.*

Assesseurs

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE

1962

UNIVERSITE DE TOULOUSE
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN.	M.	LAZORTHES
1er ASSESSEUR		BLANC
2e ASSESSEUR		N
Doyens Honoraires.	MM.	GORSE
		CALVET
		LEFEBVRE
		BRUSTIER
Professeurs honoraires. . . .	MM.	RIBAUT
		VALLOIS
		CLERMONT
		NANTA
		DUCUING
		TAPIE
		DELAS.
		RISER.
		SOULA.

SECTION MÉDECINE - PROFESSEURS

Clinique Médicale.	MM.	MERIEL
Clinique Médicale.		GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique.		FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du Cancer.		GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.		VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . .		BAZEX
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.		MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires.		LHEZ
Clinique médicale infantile et Puériculture.		SOREL
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.		GERAUD
Clinique obstétricale.		GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique.		N
Clinique ophtalmologique. .		CALMETTES
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale.		CALVET
Rhumatologie.		RUFFIÉ (R.)
Clinia. traumatolog. des membres		RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale		PONTONNIER
Anatomie.		LAZORTHES
Anatomie appliquée.		POULHES
Anatomie pathologique. . . .		FABRE (J.)
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.		ANDRIEU
Chimie biologique.		VALDIGUIE
Electro-Radiologie.		MARQUES
Embryologiegenerale		BROUSSY
Histologie.		BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie.		DARNAUD
Médecine Légale du Travail		PLANQUES
Médecine Sociale.		BOUNHOURE
Parasitologie.		BOUISSET
Pathologie chirurgicale. . .		DAMBRIN
Pathologie générale et Médecine expérimentale. . . .		SENDRAIL
Physico-Chimie.		AUVERGNAT
Physiologie.		LAPORTE (Y.)
Physiologie appliquée et Pharmacologie.		BAISSET
Physique biologique et médicale.		BUGNARD
Propédeutique médicale. . . .		N.
Thérapeutique.		DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée.	MM.	COULOUMA
Pathologie médicale.		LAPORTE (J.)
Bactériologie.	Mme	ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	MM.	DOUSTE-BLAZY
Physique médicale.		BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM.	BASTIDE
Anatomie Pathologique. . . .		BOUISSOU
Anesthésiologie		LARENG
Carcinologie		ESTRADE
Histologie et Embryologie. . . .		PLANEL
Parasitologie.		RUFFIE (J.)
Pathologie expérimentale . .		GLEIZES
Physiologie.		MONTASTRUC
Physiologie		BESSOU
Physique médicale		COMMANAY

AGREGES

Pathologie médicale.	MM.	MONNIER
Médecine générale		RIBAUT
		DELAUDE
		CALAZEL
		RASCOL
Chirurgie générale		ENJALBERT
		FICAT
		PASQUIE
		SOUQUET
		SARRAZIN
Dermatologie et syphiligra-		DUPRE
Hydrologie		DENARD
Médecine légale		GREZES-RUEFF
Obstétrique		ESPAGNO
Odontostomatologie		CADENAT (H.)
Pédiatrie		BARDIER

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie	THOMAS
Ophtalmologie	DEODATI
Oto-Rhino-Laryngologie . .	CLAUX
Pathologie Chirurgicale . . .	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE - PROFESSEURS

Botanique et cryphogamie	Mme	DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	M.	BOURBON
Chimie pharmaceutique. . . .		BLANC
Matière Médicale.		VINCENT
Pharmacie chimique Pharmacodynamie.		CAUJOLLE
Pharmaceutique galénique		STANISLAS
Zoologie	M.	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie.	M.	COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences Naturelles.	Mme	CAUJOLLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie.	MM.	BREUILLAUD
Sciences Physiques.	M.	PITET
Tixocologie		BROUSSY (G.)

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal.	M.	ROCHE
Secrétaire.		BERRUT.

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A MA FEMME

A MES PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. DELAS

Professeur honoraire.
Chevalier de la Légion d'honneur.

Qu'il veuille bien nous permettre de lui témoigner notre respectueuse gratitude pour la bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. BOUISSET

Officier de la Légion d'honneur,

Médaille militaire,

Professeur de Parasitologie à la Faculté.

Nous vous remercions de nous avoir accepté parmi vos moniteurs à notre arrivée à la Faculté. Nous vous exprimons notre gratitude pour la constante bienveillance que vous nous avez manifesté et l'intérêt que vous avez bien voulu accorder au déroulement de nos études.

Nous vous prions de croire à notre profonde déférence et à notre respectueux dévouement.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOURBON

Professeur de Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène Industrielle.

Nous n'oublions pas les conseils et l'aide que vous nous avez apporté tout au long de nos études jusqu'à cette année où vous nous avez accepté parmi vos collaborateurs.

Nous vous exprimons nos sincères remerciements et notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. ROUX

Professeur de Zoologie.

Nous vous remercions du grand honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à notre jury de thèse et de la bienveillance que vous voulez bien nous témoigner.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BREUILLAUD

Maître de Conférences de Sciences Naturelles.

Vous avez inspiré et guidé ce travail.

Nous vous remercions des conseils que vous nous avez prodigué au cours de nos études.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PITET

Maître de Conférence de Sciences Physiques.

Avec notre respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR G. MICHEL

A MONSIEUR V. GRIZOU

Avec nos bien sincères remerciements.

A NOS AMIS
DES LABORATOIRES DE MICROBIOLOGIE
ET DE TOXICOLOGIE

INTRODUCTION

Les premières études sur les bactéries propioniques datent de 1841. Nollner isola un microorganisme particulier qui donnait, parmi les produits de son métabolisme, de l'acide propionique. Fitz (1876-1884) discuta, dans une série d'étude sur la fermentation, de la morphologie et des activités biochimiques de ces bactéries.

Mais ce sont surtout Orla-Jensen (1898) et Freudenreich qui expérimentèrent sur ces microorganismes. Ils montrèrent qu'on les rencontre dans les produits laitiers et que c'est leur présence qui communique à certains fromages et particulièrement au fromage d'Emmenthal, son aspect et son odeur caractéristiques. Ces recherches furent poursuivies par Sherman et Shaw (1923) et par Whittier et Sherman (1923) qui ont étudié les conditions de la fermentation propionique, et par Virtanen (1925) qui expérimenta sur son mécanisme.

Ces différents résultats firent l'objet, en 1928, d'une revue générale de Van-Niel.

Ces microorganismes connurent un regain d'actualité en 1936. C'est à cette date que Wood et Werkman prouvèrent, en les utilisant dans leurs expériences, la réalité de la fixation du CO_2 par les bactéries hétérotrophes.

On sait à quel développement biologique cette découverte a donné lieu.

Telles furent les principales étapes des recherches faites sur les *Propionibacterium*. Elles s'axèrent surtout sur la physiologie générale de ces microorganismes et particulièrement sur leur métabolisme intermédiaire.

Néanmoins, bien des inconnues subsistent encore sur ce groupe microbien. Sa place dans la systématique bactérienne est controversée ; les caractères physiologiques des bactéries propioniques ne sont pas toujours connus avec certitude ; le mécanisme même de la fermentation est mal élucidé.

Les travaux qui ont été consacrés aux *Propionibacterium* ont porté presque uniquement sur certaines espèces et ont utilisé, dans la majorité des cas, les techniques des « resting cells », si bien que nous manquons d'informations d'ensemble sur ce groupe bactérien, ainsi que sur son métabolisme en milieu naturel.

La fermentation propionique présente un intérêt industriel. L'acide propionique entre dans la constitution de certains solvants (propionate d'éthyle) ; les mélanges acide acétique et acide propionique, qui sont les produits des hexoses par les bactéries du genre *Propionibacterium*, peuvent être traités et produire un mélange d'acétone, de méthyl-éthyl-cétone et de diéthyl-cétone, qui sont aussi des solvants.

Enfin, l'acide propionique présente un intérêt médical : ses sels peuvent être utilisés en particulier dans le traitement de certaines affections externes de l'œil.

(De plus, MAKAREVICH en 1958 et en 1959, puis PAWELKIEWICZ en 1960, ont montré que les *Propionibacterium* synthétisaient de la vitamine B_{12}.)

Il est certain qu'en sélectionnant les ferments et en définissant de manière rigoureuse les conditions de la culture et la composition du milieu, une production d'acide propionique par fermentation pourrait être envisagée.

Le travail suivant est consacré à l'étude des caractères bactériologiques, physiologiques et biochimiques des *Propionibacterium*. Il a été réalisé en expérimentant sur quelques espèces représentatives du groupe et sur des souches isolées à partir de fromages.

Les données obtenues permettront, en conclusion, de discuter de la position systématique de ces bactéries et de comparer leurs caractères avec ceux du genre voisin des *Corynebacterium*.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS SUR LES *PROPIONIBACTERIUM*

POSITION SYSTÉMATIQUE DES *PROPIONIBACTERIUM*

Les problèmes que pose la taxinomie bactérienne sont loin d'être simples. La morphologie rudimentaire des bactéries ne permet pas d'aller loin dans la description de l'espèce. La cellule microbienne doit être considérée avant tout comme une mosaïque d'antigènes et d'enzymes.

C'est pourquoi la détermination des caractères sérologiques et biochimiques permet seule de définir l'espèce, la variété ou le type.

Deux principales classifications du monde bactérien et donc deux clés de détermination existent actuellement. Elles ne sont d'ailleurs pas fondamentalement différentes et ne se distinguent que par des conceptions dissemblables touchant certains groupes bactériens et notamment celui qui nous occupe ici.

Il s'agit d'une part du système de Bergey, qui succède lui-même au système de Buchanan (1917-1925), et d'autre part de la classification de A. R. Prévot qui, selon son auteur, « est issue de ses devancières, dont elle s'est efforcée de corriger les contradictions, les erreurs et les omissions ». C'est cette classification qui sera suivi ici.

Indépendamment des *Eubacteria*, certains groupes microbiens présentent ou semblent présenter des affinités soit avec le règne animal, soit avec le règne végétal. C'est le cas des *Mycobacteria* et des Actinomycétales, auxquelles appartient le genre *Propionibacterium*.

Jusqu'en 1917, la taxinomie des Actinomycétales était chaotique. C'est à cette date que Buchanan réalisa un énorme progrès en proposant l'adoption d'un ordre des Actinomycétales, rattaché aux Schyzomycètes, mais nettement séparé des Eubactériales. La systématique de ce groupe resta cependant en discussion.

La nécessité de donner une place logique aux Actinomycétales gram négatif et gram positif a conduit Prévot, en 1946, à modifier la taxinomie des Actinomycétales, qui, dans son système, prennent le rang de classe, divisée en deux ordres : les Mycobactériales, habituellement acido-résistantes et les Actinobactériales, non acido-résistantes. Ces dernières sont subdivisées en deux familles : les *Spherophoraceæ* (gram négatif) et les *Actinomycetaceæ* (gram positif). La famille des *Actinomycetaceæ* comprend six genres : *Actinomyces*, *Proactinomyces*, *Corynebacterium*, *Actinobacterium*, *Bifidibacterium*, *Erysipelothrix* et un sous-genre : *Propionibacterium*.

Prévot, en 1953, confirma les grandes lignes de cette classification et souligna à nouveau la grande parenté des genres *Actinobacterium*, *Corynebacterium*, *Bifidibacterium* et *Propionibacterium*, qui ne diffèrent guère entre eux que par la biométrie.

Les bacilles du sous-genre *Propionibacterium* peuvent donc être définis comme des bactéries présentant des affinités avec les champignons inférieurs; ce sont des

Actinomycétales typiques, gram positif, se présentant sous la forme de bâtonnets courts ou allongés, rarement filamenteux, avec une tendance à donner des ramifications.

La position des bactéries propioniques dans la classification de Prévot nous paraît devoir supplanter la conception du manuel de Bergey. Celle-ci se fondant davantage sur l'habitat que sur les caractères biochimiques et morphologiques, classe les bactéries propioniques dans la famille des *Lactobacteriaceæ*, ce qui conduit à séparer *Corynebacterium* et *Propionibacterium*, dont nous verrons les incontestables ressemblances.

Sous-embranchement : *Mycobacteria*

Classe	:	Actinomycétales.
Ordre	:	Actinobactériales.
Famille	:	*Actinomycetaceæ.*
Genres I	:	*Actinomyces.*
II	:	*Nocardia.*
III	:	*Corynebacterium.*
Sous-genre	:	*Propionibacterium.*
IV	:	*Actinobacterium.*
Sous-genre	:	*Bifidibacterium.*
V	:	*Erysipelothrix.*
VI	:	*Listeria.*

ÉTUDES BACTÉRIOLOGIQUES ET RÉSULTATS

Nous avons étudié, au point de vue bactériologique, huit souches provenant du Service des collections de l'Institut Pasteur ou isolées et identifiées à partir de produits laitiers, tels les fromages.

Cette étude est résumée dans les huit tableaux suivants que nous détaillerons au cours de notre travail.

Au point de vue morphologique

Les *Propionibacterium* sont des bacilles à gram positif. immobiles, aciliés, sans capsule, réunis en amas ou en parallèles et ne formant pas d'endospores.

Leur taille est variable selon le milieu et les conditions de culture, mais il semble que l'on puisse distinguer deux groupes: l'un à prédominance streptococciforme, de 0,5 à 1 μ, en chaînettes ou en paires; l'autre diphtérimorphe, de 1,5 à 3 μ, souvent renflés à une extrémité et à nombreuses formes d'involution. Des variations de morphologie et de taille ont été observées, en particulier selon le milieu de culture et son potentiel d'oxydo-réduction : en milieu neutre et en anaérobiose, on obtient une majorité de formes voisines de celles des diphtéroïdes ou des streptocoques lactiques; en aérobiose, au contraire, on voit apparaître des formes d'involution plus longues, souvent renflées. En milieu acide, leur taille peut atteindre 4 μ.

Les caractères de l'appareil nucléaire des *Propionibacterium* peuvent être étudiés soit par la technique de Robinow, soit par la méthode de Piéchaud.

On constate la présence d'éléments nucléaires identiques à ceux qui furent mis en évidence chez les *Bifidibacterium* et chez les *Actinobacterium*. Il s'agit, dans les formes droites, non renflées, ou les microcoques, de petites granulations peu colorables et difficilement visibles, et dans les renflements ou les formes d'involution de grosses granulations nucléaires faciles à mettre en évidence par la coloration d'Albert. Il semble bien que, comme pour les *Actinobacterium*, le renflement correspond à une aire de multiplication de la substance nucléaire et l'on peut admettre, là encore, que ces renflements seraient les équivalents de ceux qui, chez les *Spherophoraceæ*, donnent naissance aux sphéroïdes libres. Ces faits justifient donc le rapprochement dans la classification des genres ou sous-genres *Bifidibacterium*, *Corynebacterium*, *Actinobacterium*, *Propionibacterium*.

Souche : 53164 Identifiée à : *Pr. pentosaceum.*

Origine : Service des collections de l'Institut Pasteur.

Morphologie : Aérobiose : bacilles en massue associés en courtes pallissades.
Anaérobiose : longs bacilles en chaînes enchevêtrées.

Dimensions : 3 à 4 μ.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie. Catalase : + léger.

Thermorésistance : 60°C. Température optima : 30°C.
Mobilité et cils : 0. Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène : ±. Odeur : 0.

Gélose ordinaire : pousse. Gélatine : non liquéfiée.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt filant. Lait : acidifié et coagulé.
Eau peptonée : troube et dépôt filant. Sérum coagulé : non attaqué.
VF : trouble et dépôt filant. Action sur les nitrates : réduction.
Gélose profonde : grosses colonies lenticulaires complexes. Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucides :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : +	Arabinose : +
Galactose : ++	Saccharose : +	Maltose : +	Dextrine : +
Amidon : +	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : ++	Xylose : +	Rhamnose : +	Raffinose : +
Sorbitol : +	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine : VF. + rouge neutre : néant.

Biochimie :

Amines : +	Acétoine : +	SH_2 : 0
Alcool : —	Phénols : —	NH_3 : 0,300 g ‰
Ethanol : —	Indol : —	Ac. lactique : +
Aldéhydes : —	Scatol : —	Ac. succinique : 0
Acétone : —	Cresol : —	Ac. pyruvique : 0

Acidité volatile : 6 g ‰.

pH final : 4,6.

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.
Toxine : 0.
Hémolysine : 0.

Souche : 8904. Identifiée à : *Pr. rubrum.*

Origine : Service des collections de l'Institut Pasteur.

Morphologie : Aérobiose : bacilles courts - diphtéroïdes - formes d'involution.
Anaérobiose : bacilles cocciformes associés en paires ou en amas.
Dimensions : 1 à 2 μ, parfois 3 à 4 μ en aérobiose.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie.
Catalase : +.
Thermorésistance : 60°C
Température optima : 30°C.
Mobilité et cils : 0.
Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène : faible.
Odeur : 0.

Gélose ordinaire : Colonies « smooth » pigmentées.
Gélatine : non liquéfiée.
Bouillon ordinaire : léger trouble plus dépôt rouille.
Lait : non coagulé.
Eau peptonée : léger trouble plus dépôt rouille.
Sérum coagulé : non attaqué.
VF. : léger trouble plus dépôt rouille.
Action sur les nitrates : néant.
Gélose profonde, colonies lenticulaires complexes pigmentées.
Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : ++	Lactose : ++	Arabinose : ++
Galactose : ++	Saccharose : ++	Maltose : ++	Dextrine : —
Amidon : —	Glycérine : ++	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : —	Rhamnose : —	Raffinose : +
Sorbitol : —	Monnitol : ++	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine :
VF. + rouge neutre : pourpre vineux.

Biochimie :

Amines : —	Acétoine : ++	SH_2 : 0
Alcool : —	Phénols : —	NH_3 : 0,300 g ‰
Ethanol : —	Indol : —	Ac. lactique : +
Aldéhydes : —	Scatol :	Ac. Succinique : —
Acétone : —	Cresol : —	Ac. pyruvique : + léger

Acidité volatile : 5,60 %.
pH final : 4,7.

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.
Hémolysine : 0.
Toxine : 0.

Souche : Identifiée à : *Propionibacterium, technicum.*

Origine : Fromage

Morphologie : Aérobiose : bacilles diphtérimorphes irréguliers.
Anaérobiose : bacilles sreptococciformes en paires et chaînes.

Dimensions : 0,8 à 1,5 μ.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie. Catalase : +.
Thermorésistance : 60°C Température optima : 30°C.
Mobilité et cils : 0. Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène : Odeur : néant.

Gélose ordinaire : pousse légère.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt floculeux.
Eau peptonée : trouble et dépôt floculeux.
VF. : trouble et dépôt floculeux.
Gélose profonde : colonies lenticulaires.

Gélatine : non liquéfiée.
Lait : coagulé et acidifié.
Sérum coagulé : non attaqué.
Action sur les nitrates : non réduits.
Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : +	Arabinose : +
Galactose : +	Saccharose : +	Maltose : +	Dextrine : +
Amidon : +	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : —	Rhamnose : —	Raffinose : +
Sorbitol : —	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +
LVF. + Safranine :		VF. + rouge neutre :	

Biochimie :

Amines :	Acétoine :	SH_2 : 0
Alcool :	Phénols :	NH_3 :
Ethanol :	Indol :	Ac. lactique :
Aldéhydes :	Scatol :	Ac. succinique :
Acétone :	Cresol :	Ac. pyruvique :

Acidité volatile :

pH final :

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.
Toxine : 0.
Hémolysine : 0.

Souche : 5965 Identifiée à : *Pr. jensenii.*

Origine : Service des collections de l'Institut Pasteur.

Morphologie : Aérobiose : bacilles diphtérimorphes irréguliers.
Anaérobiose : bacilles streptococciforme en petites chaînettes - formes d'involution.

Dimensions : 0,5 à 1 μ en anaérobiose. 1,5 μ en aérobiose.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie. Catalase : ++.
Thermorésistance : 60°C Température optima : 30°C.
Mobilité et cils : 0. Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène : +. Odeur : 0.

Gélose ordinaire : pousse. Gélatine : non liquéfiée.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt orangé. Lait : coagulé et acidifié.
Eau peptonée : trouble et dépôt orangé. Sérum coagulé : non attaqué.
VF. : trouble et dépôt orangé. Action sur les nitrates : néant.
Gélose profonde : colonies lenticulaires complexes minuscules. Odeur : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : +	Arabinose : —
Galactose : +	Saccharose : +	Maltose : +	Dextrine : —
Amidon : —	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : ±	Rhamnose : —	Raffinose : +
Sorbitol : ±	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine : VF + rouge neutre : pourpre vineux.

Biochimie :

Amines : —	Acétoine : +	SH_2 : 0
Alcool : —	Phénols : —	NH_3 : 0,300 g ‰
Ethanol : —	Indol : —	Ac. lactique : 0
Aldéhydes : —	Scatol : —	Ac. succinique : 0
Acétone : —	Cresol : —	Ac. pyruvique : 0

Acidité volatile : 6,66 g ‰.

pH final : 4,5.
Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.
Toxine : 0.
Hémolysine : 0.

Souche : Identifiée à : *Pr. arabinosum.*

Origine : Fromage.

Morphologie : Aérobiose : bacilles assez longs irréguliers.
Anaérobiose : bacilles streptococciformes en paires ou chaînettes.

Dimension : 0,8 μ à 1 μ en anaérobiose et 3 μ en aérobiose.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.

Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie.
Thermorésistance : 60°C
Mobilité et cils : 0.
Catalase : + léger.
Gélatine : non liquéfiée.
Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène : Odeur : propionique.

Gélose ordinaire : colonies « smooth » pigmentées.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt filant.
Eau peptonée : trouble et dépôt filant.
VF. : trouble et dépôt filant.
Gélose profonde : colonies lenticulaires.
Gélatine : non liquéfiée.
Lait : non coagulé.
Sérum coagulé : non attaqué.
Action sur les nitrates : non réduits.
Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : —	Arabinose : +
Galactose : ++	Saccharose : +	Maltose : +	Dextrine : +
Amidon : +	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : —	Rhamnose : —	Raffinose : +
Sorbitol : —	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine : VF. + rouge neutre :

Biochimie :

Amines :	Acétoine :	SH_2 : 0
Alcool :	Phénols :	NH_3 :
Ethanol :	Indol :	Ac. lactique :
Aldéhydes :	Scatol :	Ac. succinique :
Acétone :	Cresol :	Ac. pyruvique :

Acidité volatile :
pH final :

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.

Toxine : 0.

Hémolysine : 0.

Souche : Par 1. Identifiéeà : *Pr. thoenii.*

Origine : Fromage Parmesan.

Morphologie : Aérobiose : bacilles irréguliers parfois longs et en massue.
Anaérobiose : bacilles fins en pallissades.

Dimensions : 1 à 2 μ.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie.
Thermorésistance : 60°C
Mobilité et cils : 0.

Catalase : +.
Température optima : 30°C.
Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène :

Odeur : 0.

Gélose ordinaire : pousse légère.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt rouge.
Eau peptonée : trouble et dépôt rouge.
VF. : trouble et dépôt rouge.
Gélose profonde : colonies lenticulaires complexes lenticulaires mammelonnées.

Gélatine : non liquéfiée.

Lait : coagulé non acidifié.
Sérum coagulé : non attaqué.
Action sur les nitrates : non réduit.

Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : —	Arabinose : —
Galactose : +	Saccharose : +	Maltose : +	Dextrine : —
Amidon : —	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : —	Rhamnose : —	Raffinose : —
Sorbitol : —	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine :

VF + rouge neutre : pourpre vineux.

Biochimie :

Amines : +	Acétoine : +	SH_2 : 0
Alcool : —	Phénols : —	NH_3 : 0,400 g ‰
Ethanol : —	Indol : ±	Ac. lactique : +
Aldéhydes : —	Scatol : —	Ac. succinique : 0
Acétone : —	Cresol : —	Ac. pyruvique : 0

Acidité volatile : 5,2 g ‰.

pH final : 4,6.

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Pouvoir pathogène : 0.

Toxine : 0.

Hémolysine : 0.

Souche : [redacted] Identifiée à : *Pr. shermanii.*

Origine : Fromage.

Aérobie : bacilles irréguliers diphtérimorphes - formes d'involution.

Morphologie :

Anaérobie : bacilles streptococciques en paires et courtes chaînettes.
Dimension : 0,8 μ à 2 μ.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie.
Thermorésistance : 60°C
Mobilité et cils : 0.
Catalase : +.
Température optima : 30°C.
Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène :
Odeur : néant.

Gélose ordinaire : pousse légère.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt.
Eau peptonée : trouble et dépôt.
VF. : trouble et dépôt.
Gélose profonde: colonies lenticulaires.
Gélatine : non liquéfiée.
Lait : acidifié et coagulé.
Sérum coagulé : non attaqué.
Action sur les nitrates : non réduits.
Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : +	Arabinose : +
Galactose : +	Saccharose : —	Maltose : —	Dextrine : —
Amidon : —	Glycérine : +	Inuline :	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : —	Rhamnose : —	Raffinose : —
Sorbitol : —	Mannitol : +	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine :
VF + rouge neutre :

Biochimie :

Amines :	Acétoine :	SH_2 : 0
Alcool :	Phénols :	NH_3 :
Ethanol :	Indol :	Ac. lactique :
Aldéhydes :	Scatol :	Ac. succinique :
Acétone :	Cresol :	Ac. pyruvique :

Acidité volatile :
pH final :

Ac. formique : 0.
Ac. acétique : +.
Ac. propionique : +.
Ac. butyrique : 0.
Ac. valérianique : 0.

Souche : 5932. Identifiée à : *Pr. Freudenreichii.*

Origine : Service des collections de l'Institut Pasteur.

Morphologie : Aérobiose : bacilles granuleux en massue.
Anaérobiose : bacilles streptococciformes en courtes chaînettes.
Dimensions : 0,6 μ anaérobiose à 2 μ en anaérobiose.
Spores : 0.
Capsule : 0.
Gram : positif.
Granulations métachromatiques : présence.

Physiologie : Aéro-anaérobie.
Thermorésistance : 60°C
Mobilité et cils : 0.

Catalase : 0.
Température optima : 30°C.
Longévité :

Cultures : Pouvoir gazogène :

Odeur : 0.

Gélose ordinaire : Pousse.
Bouillon ordinaire : trouble et dépôt filant.
Eau peptonée : trouble et dépôt filant.
VF. : trouble et dépôt filant.
Gélose profonde: colonies lenticulaires complexes grises.

Gélatine : non liquéfiée.
Lait : acidifié, non coagulé.
Sérum coagulé : non attaqué.
Action sur les nitrates : non réduits.
Indol : 0.

Facteurs de croissance :

Glucose : +	Levulose : +	Lactose : —	Arabinose : —
Galactose : +	Saccharose : —	Maltose : —	Dextrine : —
Amidon : +	Glycérine : +	Inuline : —	Dulcitol : —
Mannose : +	Xylose : ±	Rhamnose : —	Raffinose : —
Sorbitol : +	Mannitol : —	Ac. Lactique : +	Ac. Pyruvique : +

VF. + Safranine :

VF. + rouge neutre : 0.

Biochimie :

Amines :	Acétoine : +	SH_2 : 0
Alcool :	Phénols :	NH_3 : 0,300 g ‰
Ethanol :	Indol :	Ac. lactique :
Aldéhydes :	Scatol :	Ac. succinique :
Acétone :	Cresol :	Ac. pyruvique :

Acidité volatile :
pH final :

Ac. formique :
Ac. acétique :
Ac. propionique :
Ac. butyrique :
Ac. valérianique :

Pouvoir pathogène : 0.
Toxine : 0.
Hémolysine : 0.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA NUTRITION

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LA NUTRITION MICROBIENNE

Comme pour toutes les cellules vivantes, les constituants essentiels de la cellule microbienne sont des éléments organiques: protides, glucides et lipides (souvent associés entre eux pour former des édifices cellulaires extrêmement complexes), ainsi que certains éléments minéraux.

Pour que la croissance et la multiplication des bactéries se produisent dans les conditions artificielles du laboratoire, il est indispensable que tous les éléments constitutifs du corps microbien puissent être synthétisés à partir des composants du milieu de culture.

On appelle besoins nutritifs d'une espèce microbienne la liste des composés chimiquement définis ou non, en présence desquels la croissance de l'espèce est maxima.

L'étude de la nutrition cellulaire constitue un des chapitres les plus importants de la Microbiologie générale. La nature des besoins nutritifs d'une espèce bactérienne exprime, en fait, deux des caractéristiques fondamentales de sa physiologie; la possibilité pour cette espèce de se procurer de l'énergie à partir de telle ou telle source organique ou minérale, et son pouvoir de synthèse.

Il est classique d'opérer une distinction dans les besoins nutritifs nécessaires aux bactéries. Certains composés

seront utilisés pendant la croissance microbienne et procureront à la cellule l'énergie dont elle a besoin pour ses synthèses, d'autres vont constituer des éléments constructifs que la cellule utilisera pour édifier ses molécules cytoplasmiques.

Mais cette distinction entre éléments « énergétiques » et éléments « plastiques » est arbitraire. Il n'existe pas entre ces groupes de séparation nette. Les amino-acides, par exemple, peuvent être utilisés par certaines bactéries à la fois comme éléments plastiques et énergétiques. Il en est de même des molécules glucidiques, éléments énergétiques par excellence, mais qui, par l'intermédiaire de leurs produits de dégradation, vont pouvoir constituer des sources à partir desquelles de nombreux composés carbonés cellulaires seront synthétisés.

Indépendamment de ces éléments nutritifs, certaines espèces microbiennes, à pouvoir de synthèse limité, vont exiger la présence dans leur milieu de culture, de constituants particuliers chimiquement définis ou non : les facteurs de croissance. La nature de ces facteurs de croissance est souvent caractéristique d'une espèce déterminée.

Si l'on considère, d'une part, les besoins nutritifs (plastiques et énergétiques) et, d'autre part, le pouvoir de synthèse des microorganismes, on peut définir un certain nombre de groupes distincts. On observera de groupe à groupe une augmentation progressive dans les exigences nutritives et une diminution du pouvoir de synthèse s'accompagnant d'une dépendance de plus en plus étroite vis-à-vis des autres formes de vie.

LA NUTRITION CHEZ LES *PROPIONIBACTERIUM*

Nous considèrerons ici le problème de la nutrition dans le sens de KNIGHT : « détermination de l'ensemble des constituants chimiquement définis ou non qui sont nécessaires et qui, de façon optima, *permettent la croissance d'une masse cellulaire abondante, à partir d'un ensemencement minime* ».

Rappelons que le milieu de culture doit contenir l'ensemble des matériaux transformables ultérieurement en matière vivante par l'espèce microbienne considérée. Nous étudierons donc successivement :

— La nutrition azotée, ce qui nous amènera à poser le problème des facteurs de croissance;

— La nutrition carbonée.

Mais même si tous les éléments nutritifs indispensables existent dans le milieu de culture, les bactéries ne s'y développeront que dans certaines conditions physico-chimiques de pH, de température et de potentiel d'oxydo-réduction que nous préciserons immédiatement. Les *Propionibacterium* sont des microorganismes anaérobies microaérophiles; la température optima est de 30°C et le pH optimum de 7-7,2.

TECHNIQUES GÉNÉRALES D'ÉTUDES DE LA NUTRITION

Elles sont basées sur l'estimation de la croissance microbienne dans des milieux de culture de composition définie.

Pour apprécier cette variable, on peut avoir recours à des techniques chimiques. Elles reposent toutes sur le même principe : la détermination quantitative d'un des produits du métabolisme microbien dont la valeur est considérée comme proportionnelle à la croissance bactérienne, c'est-à-dire à la teneur du milieu en cellules de culture et croissances bactériennes vivantes. Néanmoins. activité chimique du filtrat de culture et croissance microbienne ne sont pas exactement superposables, de même que l'étude de la toxigénèse ne peut être une bonne méthode d'estimation de la croissance d'une espèce microbienne toxinogène : certains ions peuvent être indispensables (par exemple Fe^{+++} chez *Corynebacterium diphteriæ*) à la synthèse d'un principe actif ou à la formation de produits particuliers du métabolisme. sans que leur absence retentisse forcément sur la croissance, c'est-à-dire sur la densité microbienne.

L'évaluation de la population microbienne est une technique beaucoup plus précise. Deux types de méthodes peuvent alors être utilisés :

— Numération des bacilles vivants, c'est-à-dire capables de se reproduire dans des conditions expérimentales déterminées;

— Numération directe des corps microbiens.

La première méthode consiste à ensemencer, aux différentes phases de la culture, une quantité déterminée du milieu sur des plaques de gélose nutritive en boîte de Pétri et à compter, après un temps d'incubation convenable, les colonies apparues. Bien que simple et classique, nous n'avons pas utilisé cette technique; elle nécessite, en effet, lorsqu'on veut opérer sur un certain nombre d'échantillons, un matériel important, car, pour être exacte, cette méthode exige une interprétation statistique donc la multiplication des essais. Signalons, d'autre part, après Monod, que cette technique permet de se faire une idée de la vitalité des cultures, mais ne peut en aucune façon constituer une mesure de leur accroissement réel; entre le nombre d'individus capables de donner naissance à une colonie sur plaque de gélose nutritive et le nombre d'individus présents dans la culture, il n'existe et ne peut exister que des rapports indéterminés qui se modifient au cours de la croissance et dépendent d'une foule de conditions expérimentales qu'il est impossible de déterminer toutes.

La seconde technique : numération directe des corps microbiens, est la seule possible ici. La variable intéressante est la *quantité de matière vivante* présente dans la culture à un moment déterminé de la croissance. Cette valeur peut être facilement appréciée par mesure de la densité optique de la culture, dont on suit l'évolution dans des conditions expérimentales rigoureusement fixées.

Exposé de la technique utilisée

La densité optique de la culture est mesurée au photomètre de KIPP et ENGELS. Les résultats sont exprimés en densité optique. Comme signale RAYNAUD, la densité optique n'est proportionnelle à la densité bactérienne que pour des valeurs faibles.

Pendant la phase exponentielle de croissance, des dilutions appropriées sont nécessaires pour effectuer la lecture dans la zone de proportionnalité; les résultats sont alors exprimés en unités arbitraires (nombre de divisions du photomètre déterminé par l'expérience multiplié par le taux de dilution).

Les mesures de la densité optique au cours de la croissance exigent des prélèvements fréquents, qui doivent être faits dans des conditions d'aseptie rigoureuse. Nous opérons généralement dans des Erlenmeyers de 500 cm^3, contenant 400 cm^3 de milieu de culture. Ils sont obturés avec des bouchons en caoutchouc à un trou, dans lequel passe un tube de verre bouché à son extrémité libre avec du coton cardé. L'ensemble de ce matériel est facilement stérilisé à l'autoclave. Par l'intermédiaire du tube et avec une pipette Pasteur très effilée, les prélèvements deviennent particulièrement simples et rapides, et l'aseptie est très satisfaisante.

LES SOUCHES MICROBIENNES

Parmi les dix espèces de *Propionibacterium* actuellement reconnues dans la classification de A. R. PRÉVOT, nous en avons expérimenté sur huit d'entre elles, et surtout sur les trois suivantes :

— *Pr. pentosaceum*,

— *Pr. arabinosum*,

— *Pr. shermanii*,

dont les caractères bactériologiques ont été résumés dans les tableaux précédents.

Entretien des souches

Elles sont d'abord ensemencées en séparation dans des tubes de gélose profonde selon la technique décrite par le Service des anaérobies de l'Institut Pasteur. Les colonies ainsi isolées sont entretenues par repiquage dans des tubes de Hall contenant un milieu standard facile à stocker et à préparer et permet en outre la pousse des germes anaérobies stricts, ainsi que des aérobies au-dessus du rétrécissement du tube. Ce milieu, voisin du bouillon V.F., a pour formule :

Chair musculaire	5 kg
Foie de bœuf	1,4 kg
Chlorure de sodium	19 g
Eau distillée	25 litres

Après une macération de 2 heures à 50°C, le mélange est porté 15 minutes à l'ébullition, puis filtré deux fois. Son pH est alors réglé à 7,6. Le bouillon est ensuite précipité à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes, puis filtré et reporté à l'ébullition. On y ajoute :

Proteose peptone Difco	75 g
Neo peptone Difco	12,50 g
Bacto tryptone	12,50 g
Yeast extract	75 g

Le bouillon ainsi préparé est réparti, puis stérilisé à 110°C pendant 45 minutes.

Les souches sont repiquées tous les 20 jours.

Ensemencements pour les essais

Les souches microbiennes sont repiquées plusieurs fois de suite, à intervalle de 30 à 48 heures, sur le milieu liquide de base qui servira à l'essai. Ces repiquages sont constamment faits dans les mêmes conditions : même quantité de milieu, même quantité d'inoculat, même durée d'incubation, de manière à ce que la quantité de germes de la culture de départ soit sensiblement constante.

La durée d'incubation de 48 heures a été fixée de manière à prendre les microorganismes, au moment de l'essai, dans leur phase exponentielle de croissance. On utilise alors des bactéries dans un état physiologique toujours identique et on élimine ainsi, autant que possible, tout phénomène parasite d'adaptation au milieu ou de récupération du potentiel vital.

L'ensemencement est effectué de telle sorte que la quantité de bactéries introduites dans l'essai soit constante d'un essai à l'autre; elle correspond à 0.10 cm^3 d'une culture prise en phase exponentielle de croissance pour 400 cm^3 de milieu (ce qui correspond approximativement à 0,01 mg de corps bactérien, en poids sec).

Expression des résultats

Nous avons essentiellement considéré dans ces essais :

1. *La phase de latence et son importance dans le temps* (temps de latence).

Elle comprend la période qui s'étend entre l'incubation et le moment où s'établit le taux de croissance constant et maximum caractéristique de la phase exponentielle.

La durée de cette phase de latence est sous la dépendance de nombreux facteurs : qualité de l'inoculat et nature du milieu utilisé.

Les facteurs qui dépendent de la qualité de l'inoculat ou de son origine, c'est-à-dire : composition du milieu de repiquage et âge de l'inoculum sont facilement éliminés dans la technique que nous employons :

a) par repiquage préalable des souches avant l'essai dans le milieu de base qui servira à l'essai;

b) par chauffage préalable du milieu ensemencé à la température d'incubation de l'essai;

c) par emploi d'inoculum correspondant à des bactéries prises au moment de leur phase active de croissance.

Dans notre expérimentation, la durée de la phase de latence sera donc sous la seule dépendance de la nature et de la composition du milieu de culture utilisé, c'est-à-dire des qualités nutritives qu'il offrira à l'espèce microbienne utilisée dans l'essai. L'estimation du temps de latence permettra, en particulier, d'apprécier la présence, dans le milieu, de facteurs stimulants, ou de facteurs de départ.

2. *Le rendement de la croissance.*

En étudiant la croissance totale des cultures, en fonction de la concentration d'un aliment déterminé et en l'absence de tout autre facteur limitant, on évalue, en fait, le rendement de cette croissance.

Le rendement est exprimé par l'équation :

$$M = K (C - Co),$$

dans laquelle :

M = croissance totale,

K = rendement,

C = concentration de l'aliment,

Co = concentration d'entretien.

Co étant nul, ou la concentration d'entretien, si elle existe, étant assez petite pour échapper à l'expérience, le rendement de la croissance est finalement donné par le rapport :

$$K = \frac{\text{Croissance totale}}{\text{Concentration de l'aliment}}$$

Insistons sur le fait que la définition et la mesure du rendement de la croissance est la condition préalable à toute recherche sur le rendement des synthèses en fonction de la nature des aliments.

LE PROBLÈME DES FACTEURS DE CROISSANCE

Beaucoup plus que la nature de la source d'azote, c'est la présence dans le milieu de facteurs de croissance qui importe à la culture de ces microorganismes.

Découvert par WILDIERS, puis clairement défini par LWOFF, le facteur de croissance pour un organisme déterminé est une substance quelconque, qu'il est incapable de synthétiser et dont il a néanmoins besoin pour se développer. Par convention, on ne considère comme facteur de croissance, ni les éléments (sous leur forme oxydée), ni les aliments carbonés énergétiques, d'ailleurs largement interchangeables. Le facteur de croissance se distingue aussi du « stimulant » qui favorise le développement, mais n'est pas strictement indispensable; du facteur « conditionnel » qui n'est exigé que dans certaines circonstances particulières; du facteur « de départ » qui, indispensable lors d'un premier isolement, est synthétisé ensuite, grâce à l'intervention d'enzymes adaptatifs. Selon l'expression de LWOFF, les facteurs de croissance sont pour les microorganismes ce que sont les vitamines pour les métazoaires.

Vitamines et facteurs de croissance ne sont requis qu'en infime quantité, ce qui s'explique aisément puisque certains d'entre eux sont des fractions importantes de systèmes enzymatiques.

On peut considérer comme acquis que les facteurs de croissance sont des constituants cellulaires fondamentaux, des métabolites essentiels, dont le rôle et l'importance sont généraux. Ou bien ils sont requis par les cellules qui n'en peuvent effectuer la synthèse, ou bien ils sont bâtis de toute pièce par les cellules qui n'exigent pas leur présence dans les milieux nutritifs où ils vivent. Il est admis que les microorganismes « exigeants » ont perdu leur faculté de synthèse au cours d'une évolution physiologique régressive.

L'extrait de levure représente, comme nous l'avons vu, la substance complexe la plus favorable à la nutrition azotée des bactéries propioniques. Mais quels sont, dans sa composition, les éléments indispensables à la croissance de ces microorganismes ?

La composition de l'extrait de levure est caractérisée par une forte teneur en protéines. Les albumines de la levure contiennent tous les acides aminés indispensables : lysine, tryptophane, méthionine, etc., et un tripeptide : le glutathion, dont on connaît l'importance dans les phénomènes biologiques. De plus, les levures renferment des corps stéroliques et des acides nucléiques, éléments fondamentaux de l'équilibre cellulaire ; elles contiennent encore des lipides et des substances glucidiques.

Mais, à côté de leur richesse en azote, leur principale caractéristique est leur richesse en vitamines. On y trouve toutes les vitamines du groupe B : B_1, B_2, PP, acide panthoténique, pyridoxine, B_6, acide folique, biotine et des substances rattachables à ce groupe vitaminique : méso-inositol, acide para-amino-benzoïque, etc.

Les problèmes expérimentaux qui se posent peuvent se résumer de la manière suivante :

— Quelle est dans l'extrait de levure la partie indispensable à la nutrition des bactéries propioniques : éléments protéiques (et en particulier aminoacides) ou éléments vitaminiques ?

— Si la partie vitaminique de l'extrait de levure est en cause, quels sont les facteurs du groupe B qui sont indispensables à la culture des *Propionibacterium* ?

— Indépendamment de l'extrait de levure, existe-t-il d'autres principes nutritifs, indispensables, adjuvants ou stimulants ?

Importance comparée des éléments vitaminiques et des acides aminés dans la nutrition des *Propionibacterium*

Il est facile d'apprécier expérimentalement l'importance relative de ces divers éléments. Il suffit d'ensemencer les bactéries tests, d'une part dans un milieu nutritif contenant de l'extrait de levure et d'autre part dans un milieu où la partie azotée est constituée par un hydrolysat enzymatique de caséine, exempt de substances vitaminiques. Cet hydrolysat apporte, par contre, tous les acides aminés indispensables à la croissance microbienne.

Milieux utilisés

a) *Milieu à l'extrait de levure :* Nous avons utilisé une formule simple :

Eau de levure contenant la base minérale (1)	100 ml
Glucose	0,20 g
pH réglé à 7-7,1.	

Préparation de l'eau de levure : On traite à l'autoclave à 120°C pendant trois heures, une suspension de 100 g de levure du commerce dans un litre d'eau. Le liquide obtenu après refroidissement et décantation est filtré sur Kieselguhr avant d'être additionné de glucose et de sels minéraux.

b) *Milieu à l'hydrolysat pancréatique de caséine :* Nous avons utilisé un milieu Difco: le bacto-vitamin free casamino acids. Il s'agit d'un hydrolysat acide et enzymatique de caséine, l'hydrolyse étant conduite jusqu'à ce que toutes les substances protéiques de la caséine soient

(1) Les sels minéraux utilisés sont ceux de la solution de Speakman.

PO_4 K H_2	1 000 cm³
PO_4 K_2 H	0,5 g
SO_4 Mg $7H_2O$	0,5 g
SO_4 Mn $4H_2O$	0,2 g
SO_4 Fe $7H_2O$	0,01 g
ClNa	0,01 g
Eau distillée	0,01 g

converties en acides aminés. C'est ce milieu de base qui est généralement utilisé pour le dosage microbiologique des vitamines.

c) *Plasmolysat de levure :* 250 g de levure pressée du commerce, dissociée dans de l'eau distillée stérile, sont placés dans un vase à fermentation. On laisse l'autolyse s'effectuer à 37°C. Le liquide surnageant, de teinte brune, est stérilisé par filtration et réparti en ampoules. Il peut être ajouté extemporanément au milieu de culture, à raison de 0,20 cm^3 pour 100 cm^3 de milieu.

Résultats

Ils sont donnés dans les tableaux I, II, III.

On constate que les trois espèces bactériennes étudiées : *P. pentosaceum*, *P. arabinosum*, *P. shermanii*, ne cultivent pas dans un milieu contenant du glucose et tous les acides aminés indispensables. Par contre, la croissance microbienne s'effectue normalement dans un milieu où l'élément azoté est représenté par l'eau de levure.

Remarquons que dans ces deux milieux, les éléments minéraux sont apportés en quantités largement suffisantes. Les oligo-éléments ne peuvent donc être en cause et c'est la partie vitaminique de l'extrait de levure qui est indispensable à la croissance des *Propionibacterium*. La preuve absolue en est facile. Si au milieu B : hydrolysat pancréatique de caséine et glucose, on ajoute une quantité très faible (0,10 cm^3 pour 1 000 cm^3) de plasmolysat de levure, le nouveau milieu obtenu permet une croissance normale des espèces microbiennes étudiées.

ÉTUDE DE LA PARTIE VITAMINIQUE DE L'EXTRAIT DE LEVURE

Wood et ses collaborateurs ont pu obtenir, à partir de l'extrait de levure, une partie éthéro-soluble qui contient la totalité des principes actifs, puisqu'elle permet la culture de toutes les bactéries propioniques testées. Ces facteurs sont également solubles dans le chloroforme, le benzène, l'éther, le xylène et pratiquement insolubles dans l'éther de pétrole. Ils peuvent être adsorbés sur charbon actif et élués avec un mélange acide-alcool. Le problème de l'isolement du principe actif et de sa caractérisation n'est cependant pas entièrement résolu.

Il a été démontré, en effet, que les facteurs de croissance apportés par l'extrait de levure, ne peuvent être remplacés par des mélanges contenant, indépendamment des substances azotées comme l'uracyl ou la phényl-alanine, des facteurs vitaminiques tels que vitamine B_1, acide pantothénique et amide nicotinique, qui sont néanmoins des facteurs de croissance fréquemment indispensables aux microorganismes. Par contre, certains extraits de tissus végétaux (pomme de terre) ou animaux (foie) ont le même effet sur la croissance des bactéries propioniques que l'extrait de levure.

Nous avons comparé l'effet sur la croissance des *Propionibacterium*, du plasmolysat de levure, d'une part et d'autre part d'une préparation contenant les principales vitamines du groupe B, à une concentration voisine de celle de l'extrait de levure.

Milieux utilisés

Le milieu de base est toujours identique à celui que nous avons précédemment défini : hydrolysat de caséine exempt de vitamines + glucose.

On ajoutait à 100 cm^3 de ce milieu, soit 0,10 cm^3 d'extrait de levure, soit un mélange contenant :

Vitamine B_1	0,001 g
Vitamine B_2	0,002 g
Amide nicotinique	0,020 g
Vitamine B_6	0,002 g
Panthoténate de calcium	0,003 g

Résultats

Ils sont exprimés dans les graphiques 1, 2, 3. On peut constater que le mélange vitaminique apporté au milieu de base, bien que contenant des facteurs particulièrement importants dans la vie microbienne, n'a pas sur la croissance des *Propionibacterium* un effet comparable à celui du plasmolysat de levure. C'est celui-ci qui est, de loin, la meilleure source de facteurs de croissance pour les bactéries propioniques.

TABLEAU 1

Propionibacterium pentosaceum

	CROISSANCE TOTALE (unités de densités)				
	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	5e jour
Extrait de levure.	3	6	20	40	50
Hydrolysat de caséine.	4	4	4	4	4

TABLEAU 2

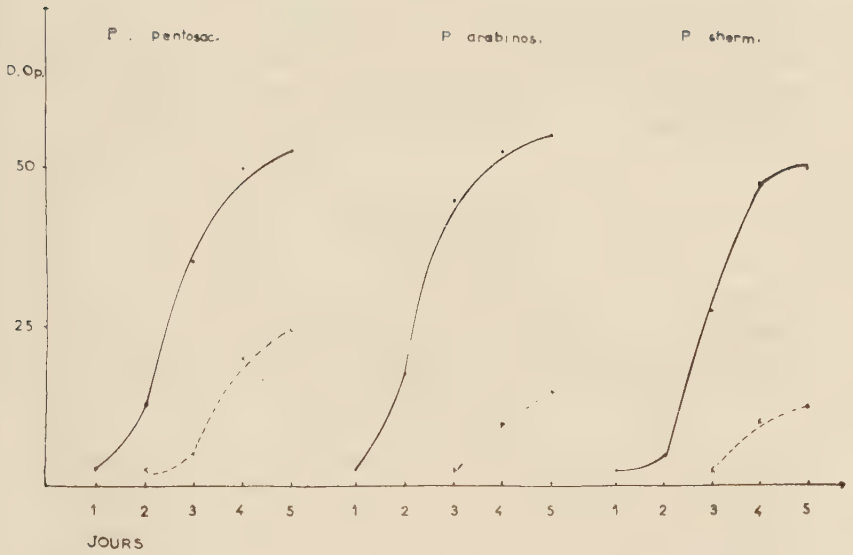
Propionibacterium arabinosum

	CROISSANCE TOTALE (unités de densités)				
	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	5e jour
Extrait de levure.	3	17	46	55	58
Hydrolysat de caséine.	3	5	5	5	5

TABLEAU 3

Propionibacterium shermanii

	CROISSANCE TOTALE (unités de densités)				
	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	5e jour
Extrait de levure.	3	10	15	45	50
Hydrolysat de caséine.	3	4	5	5	5



Graphiques 1, 2, 3. — Effet sur la croissance du plasmolysat de levure (—) d'une préparation contenant des vitamines du groupe B (—).

INFLUENCE SUR LA CROISSANCE DE L'EXTRAIT GLOBULAIRE ET DES PRÉPARATIONS D'HÉMOGLOBINE

Une étude sur les facteurs nutritionnels des *Corynebacterium* microaérophiles nous a montré que de l'extrait globulaire ajouté au milieu à une dose de 1 % environ provoquait une croissance rapide et maximale de ces bactéries.

Les *Propionibacterium* étant physiologiquement voisins des *Corynebacterium* microaérophiles étudiés, il nous a paru opportun d'étudier l'influence de l'extrait globulaire sur la culture des bactéries propioniques.

Milieux utilisés

Le milieu de base (hydrolysat de caséine-glucose) était additionné, soit d'extrait globulaire seul, à la dose de 1 pour 1 000, soit d'extrait globulaire et de plasmolysat de levure, à la dose de 0,10 pour 1 000.

Préparation de l'extrait globulaire : un caillot sanguin (sang de cheval) est dissocié dans l'eau distillée stérile et maintenue à 70°C pendant une demi-heure. Le liquide surnageant est stérilisé par filtration sur bougie Chamberland L3 et réparti en ampoules.

Résultats

Ils sont exprimés dans le tableau 4.

L'extrait globulaire seul, ajouté à un milieu exempt des substances vitaminiques contenues dans l'extrait de levure, ne permet qu'imparfaitement la croissance des trois espèces de *Propionibacterium* étudiées. On constate néanmoins que dans les milieux contenant de l'extrait de levure, la présence d'extrait globulaire augmente légèrement la croissance et son rendement.

Il a été démontré que l'extrait globulaire apporte deux facteurs de croissance indispensables à certaines bactéries et particulièrement aux *Hemophilus* : le facteur B, spé-

cialement étudié par LWOFF, est identique au coenzyme I préparé à partir de la levure et le facteur X qui est un composé pyrrolique et qui peut être remplacé soit par du sang total, soit par des préparations à base d'hémoglobine.

Il est probable que le coenzyme I, qui existe dans la levure et dans les extraits que nous employons, soit le facteur stimulant de l'extrait globulaire. La fraction hématique est sans doute la plus intéressante. C'est ce que démontre l'effet obtenu par addition de 1 % d'une solution d'hémoglobine au milieu de base.

La stimulation inconstable qu'apporte ce type de préparation est sans doute en rapport avec le type respiratoire des *Propionibacterium*. Nous verrons ultérieurement que ces bactéries sont des anaérobies microaérophiles et qu'elles possèdent une catalase positive. La présence du composé hématique favorise, sans doute, la formation de l'enzyme et corrélativement l'augmentation de la croissance.

Si cette hypothèse est exacte, c'est en zone aérobie que l'effet des préparations d'hémoglobine devrait être maxima. Nous l'avons vérifié sur *Propionibacterium pentosaceum*, qui possède normalement une activité catalasique faible.

En conclusion :

— Les *Propionibacterium* étudiés sont des microorganismes à pouvoir de synthèse limité.

— L'extrait de levure est la source la plus intéressante en facteurs de croissance. L'acide pantothénique, la nicotamide, la vitamine B_1, la riboflavine, sont d'inconstables

métabolites essentiels, mais leur activité, même en association, reste inférieure à celle de l'extrait total de levure. Nous sommes donc en présence de besoins complexes.

L'extrait globulaire et les préparations d'hémoglobine sont d'intéressants facteurs stimulants. Leur action, qui s'exerce particulièrement en milieu aérobie, est en rapport avec le type respiratoire des *Propionibacterium*.

Tableau 4

	P. pentosaceum		*P. arabinosum*		*P. shermanii*	
	Croissance totale en unités de d. opt.	Rendement en (f) glucose	Croissance totale en unités de d. opt.	Rendement en (f) glucose	Croissance totale en unités de d. opt.	Rendement en (f) glucose
Hydrolysat, caséine + extrait globulaire. .	30	15	20	10	20	10
Hydrolysat, caséine + plasmolysat levure.	75	35	45	22,5	50	25
Hydrolysat, caséine + plasmolysat levure + extrait globulaire. .	80	40	50	25	60	30

NUTRITION AZOTÉE

Les besoins azotés des bactéries hétérotrophes sont variables.

On doit distinguer :

— des microorganismes utilisant l'azote en combinaisons minérales simples : sels d'ammonium, nitrates, azote gazeux ;

— des microorganismes incapables d'utiliser l'ammoniaque, mais utilisant certains acides aminés ;

— des microorganismes, enfin, n'utilisant que des sources azotées complexes, apportées dans le milieu de culture sous forme d'extraits tissulaires ou de protéolysats. Ces microorganismes ont, en général, un pouvoir de synthèse très limité et exigent des facteurs de croissance, qui leur sont d'ailleurs fournis en même temps que la source azotée, par les protéolysats ou les extraits tissulaires servant de base au milieu de culture.

Les bactéries propioniques appartenant au « genre *Propionibacterium* Orla-Jensen » sont d'une culture difficile et paraissent exiger que l'azote leur soit apporté obligatoirement sous forme d'azote organique.

Orla-Jensen et Freudenreich les isolèrent d'abord sur un milieu peptoné. Van Niel, continuant les travaux d'Orla-Jensen et de ses successeurs, conclut que les *Propionibacterium* étaient incapables de croître en milieu

minéral. La meilleure des sources azotées est l'eau de levure ou l'extrait de levure, qui permet une croissance normale de ces bactéries.

Cette particularité de la nutrition des bactéries propioniques peut s'expliquer soit par le fait que des sources azotées organiques, en particulier des acides aminés contenus dans l'extrait de levure, leur sont indispensables ; soit parce qu'elles exigent la présence dans le milieu d'éléments vitaminiques sans lesquels l'utilisation des aliments devient impossible.

SOURCES AZOTÉES

Certains auteurs, et particulièrement ORLA-JENSEN, ont rapproché les bactéries propioniques des bactéries lactiques. On a voulu voir entre ces deux groupes des ressemblances très étroites, tant sur le plan morphologique (nous l'avons déjà signalé) que sur le plan métabolique : l'acide lactique, produit final de la fermentation chez les Lactobactéries, a été considéré pendant longtemps comme un composé intermédiaire dans la fermentation propionique. En est-il de même sur le plan nutritif ?

D'un travail d'ensemble d'ORLA-JENSEN paru en 1919 et cité par LAROUX, on peut conclure que les bactéries lactiques sont incapables de croître en présence de sels ammoniacaux ou d'amino-acides et qu'elles exigent, en tant que source azotée, un apport de protéines complexes et la totalité des acides aminés qu'elles contiennent. DAVIS et MATTICK montrent que certaines d'entre elles : *Streptococcus lactis* et *Lactobacillus casei*, sont incapables de se développer dans un milieu contenant, en plus du glucose et de la base minérale, un mélange de neuf amino-acides: Asparagine, Alanine, Tyrosine, Acide glutamique, Glycine, Tryptophane, Histidine, Cystine et Valine.

Ce n'est d'ailleurs pas le cas de toutes les bactéries lactiques, puisque ORLA-JENSEN montra ultérieurement l'hétérogénéité de ce groupe; certaines espèces sont incapables d'utiliser les sels ammoniacaux en présence de facteurs de croissance. Il en est de même de *Pr. pento-*

saceum, ainsi que de *Pr. zeæ* et de *Pr. thoenii*. Mais dans quelles conditions se fait alors la croissance et quel est son rendement ?

Nous comparerons dans cette étude l'action des sels minéraux azotés d'une part et des protéolysats d'autre part sur la croissance des bactéries propioniques.

Milieux utilisés

Nous avons systématiquement éliminé dans cette étude l'utilisation de l'eau de levure, car elle apporterait, indépendamment des facteurs de croissance, des quantités non négligeables de facteurs nutritifs azotés différents de ceux que l'on désire étudier.

Dans nos milieux, l'apport en facteur de croissance était assuré par l'addition d'une quantité minime de plasmolysat de levure. La formule est la suivante :

Glucose.	0,20 g
Plasmolysat de levure.	0,10 ml
Eau distillée contenant la base minérale.	1 000 ml

Les sels minéraux azotés en solution dans l'eau distillée préalablement stérilisée par filtration sur bougie L3 étaient apportés extemporanément au milieu de base. Ont été ainsi étudiés :

— des sels ammoniacaux : carbonates, phosphates, sulfates, chlorures, acétates, citrates;

— nitrate de sodium.

Chacun de ces sels est ajouté au milieu de base, de manière à ce que la teneur en azote soit de 1,50 g ‰, valeur qui, au cours d'essais préliminaires, nous avait paru largement suffisante.

Résultats

Ils sont exprimés dans les tableaux 5, 6, 7.

Les différents sels ammoniacaux étudiés possèdent, sur la croissance des *Propionibacterium*, une activité très différente. Phosphates et acétates sont de loin les meilleures sources azotées minérales; chlorures et sulfates sont peu actifs. Ce phénomène est général chez les trois espèces étudiées.

Nitrate d'ammonium et nitrate de sodium sont pratiquement sans action sur la croissance.

TABLEAU 5

P. pentosaceum

	CONCENTRATION UTILISÉE (en N % cm³)	CROISSANCE TOTALE UNITÉS DE DENSITÉ	RENDEMENT (par rapport à la teneur en N)
Carbonate.	1,50 g	45	30
Phosphate.	»	60	40
Sulfate.	»	40	26
Chlorure.	»	35	23
Acétate.	»	60	40
Citrate.	»	50	33
Nitrate.	»	20	14

TABLEAU 6

P. arabinosum

	CONCENTRATION UTILISÉE (en N % cm³)	CROISSANCE TOTALE UNITÉS DE DENSITÉ	RENDEMENT (par rapport à la teneur en N)
Carbonate.	1,50 g	40	26
Phosphate.	»	55	36
Sulfate.	»	40	26
Chlorure.	»	30	20
Acétate.	»	60	40
Citrate.	»	45	30
Nitrate.	»	15	10

TABLEAU 7

P. shermanii

	CONCENTRATION UTILISÉE (en N % cm³)	CROISSANCE TOTALE UNITÉS DE DENSITÉ	RENDEMENT (par rapport à la teneur en N)
Carbonate.	1,50 g	50	33
Phosphate.	»	70	46
Sulfate.	»	45	30
Chlorure.	»	35	23
Acétate.	»	60	40
Citrate.	»	50	33
Nitrate.	»	18	12

EFFETS DES PROTÉOLYSATS SUR LA CROISSANCE

Toutes les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser en tant que source azotée les produits de dégradation des matières albuminoïdes. Dans les milieux de culture les plus généralement utilisés en bactériologie, les peptones présentent la source à partir de laquelle les microorganismes, en utilisant de l'énergie, vont pouvoir synthétiser leurs propres protéines.

Les hydrolysats protéiques utilisés devront donc contenir les amino-acides essentiels en proportion équilibrée. Ceux-ci devront être apportés soit en nature, soit sous forme de molécules polypeptidiques susceptibles de libérer par action enzymatique les acides aminés constitutifs.

Dans la préparation de ces hydrolysats, il est indispensable d'avoir recours à une protéine complète et dont la composition, relativement fixe, permet d'obtenir des résultats facilement reproductibles.

Sur le plan bactériologique, c'est la caséine qui représente la protéine la plus intéressante. Les hydrolysats qu'elle fournit sont uniformes dans leur composition. beaucoup plus que les digestats d'autres matières protéiques et en particulier de chair musculaire.

La capacité qu'ont les bactéries hétérotrophes de synthétiser les amino-acides varie énormément d'espèce à espèce. Mais les amino-acides libres les plus généralement indispensables aux bactéries sont : le Tryptophane, la

Cystine, la Méthionine, la Tyrosine, la Phénylalanine, l'Histidine et plus rarement l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'alanine. Les bactéries pouvant avoir besoin d'amino-acides libres, il est nécessaire d'utiliser des digestats pancréatiques. Le choix que nous avons fait pour cette étude de digestat pancréatique de caséine est justifié par le fait qu'elle contient, en proportion élevée, tous les amino-acides indispensables à la croissance microbienne ou la favorisant.

La valeur microbiologique des hydrolysats de caséine a été étudiée par MAURON, WENNER et EGLI. Dans leur technique, ils utilisent une bactérie anaérobie : *Clostridium welchii.* Cette bactérie fait fermenter le glucose en donnant du CO_2 et de l'hydrogène par l'intermédiaire d'une hydrogène lyase. Il est évident que la densité microbienne en cours de culture, et donc la formation d'hydrogène lyase, sera fonction de la valeur nutritive du milieu pour *Cl. welchii.* La libération d'hydrogène, à partir du glucose, par cette bactérie, dans un milieu contenant l'hydrolysat à tester comme facteur limitant, permettra d'apprécier quantitativement la valeur nutritive de cet hydrolysat. Le schéma suivant illustre le principe de cette méthode :

Cl. welchii Hydrolysat protéique

↓ ←

Glucose + Hydrogène lyase ⟶ H_2 + CO_2

On constate que les hydrolysats pancréatiques de caséine provoquent une croissance rapide de *Cl. welchii* et qu'au bout de deux heures, la quantité d'hydrogène dégagée est huit à dix fois plus grande qu'en présence d'un hydrolysat acide.

Nous avons décrit ailleurs la technique de préparation des hydrolysats pancréatiques de caséine.

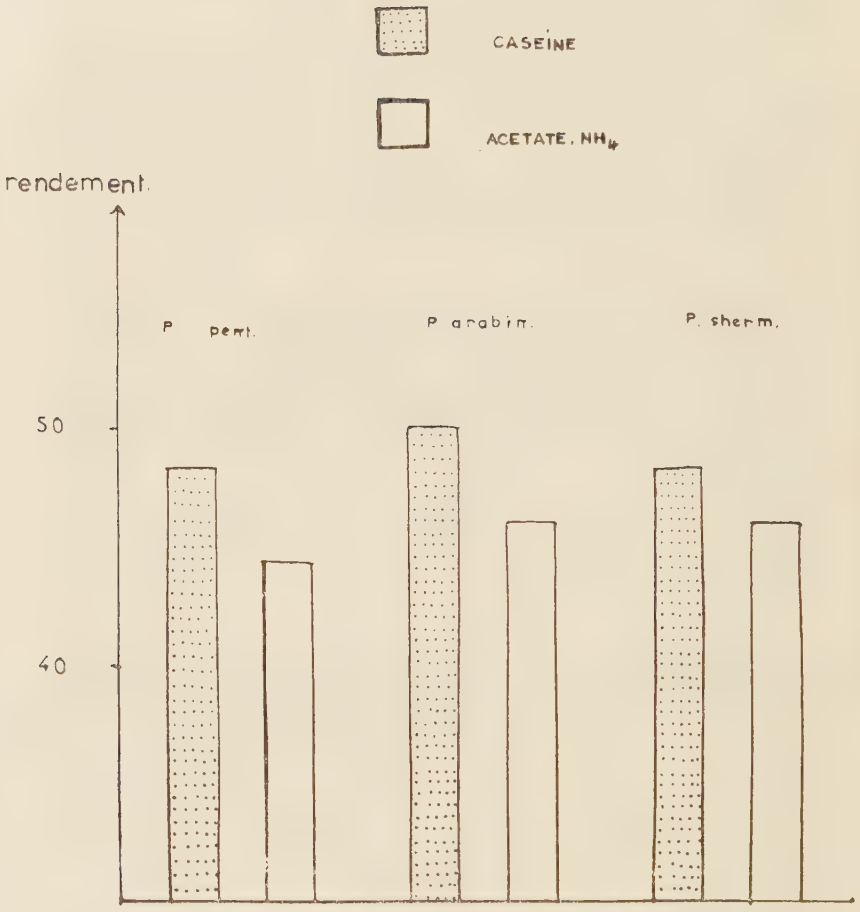
Nous avons comparé la croissance de *Pr. pentosaceum*, de *Pr. arabinosum* et de *Pr. shermanii*, sur des milieux où la source azotée était constituée soit par de l'acétate d'ammonium, soit par de l'hydrolysat pancréatique de caséine. Dans les deux cas, la teneur en azote était fixée à 1,50 g pour 1 000 ml de milieu.

Il est incontestable que l'hydrolysat pancréatique de caséine, et les acides aminés qu'il apporte, constitue la source azotée idéale pour les *Propionibacterium*. Le rendement de la croissance est nettement plus important que dans le cas où la source azotée est constituée par un sel ammoniacal.

Nos résultats sont exprimés dans le tableau 8 et le graphique 4.

Tableau 8

	P. pentosaceum		*P. arabinosum*		*P. shermanii*	
	CROISSANCE TOTALE UNITÉ D'OPT.	RENDEMENT	CROISSANCE TOTALE UNITÉ D'OPT.	RENDEMENT	CROISSANCE TOTALE UNITÉ D'OPT.	RENDEMENT
Source azotée.						
Hydrolysat pancréatique caséine. . . .	70	46	75	50	70	46
Source azotée.						
Acétate NH_4.	55	36	60	40	60	40



Grapique 4. — Rendement de la croissance dans des milieux où la source azotée est constituée soit par de l'acétate d'ammonium, soit par de l'hydrolysat pancréatique de caséine.

NUTRITION CARBONÉE

Si nous éliminons l'assimilation possible du CO_2 par la réaction de Wood et Werkmann qui fut découverte en premier lieu chez les bactéries propioniques et qui apparaît comme très générale dans le monde microbien, on constate que la nutrition carbonée des bactéries hétérotrophes est extrêmement variée. La gamme des composés susceptibles d'être utilisés varie énormément d'une espèce à l'autre, et constitue vraisemblablement une des causes principales de l'adaptation du microorganisme à son milieu.

Mais pour qu'un composé organique puisse servir de source de carbone à une espèce bactérienne donnée, il est nécessaire que certaines conditions soient remplies :

— Il faut d'abord que la bactérie puisse le décomposer et que la libération d'énergie qui accompagne cette oxydation puisse servir aux synthèses éventuelles.

— Il est ensuite nécessaire que parmi les produits de dégradation de la source carbonée, certains puissent être utilisés par la cellule pour ses synthèses.

Parmi les composés qui peuvent servir de source carbonée et énergétique aux bactéries hétérotrophes, les glucides et particulièrement les hexoses ainsi que leurs produits de dégradation, sont constamment utilisés. Le carbone des acides aminés est moins facilement utilisable et le carbone des amines ne l'est pratiquement pas.

Les besoins carbonés des *Propionibacterium* sont assez bien connus. Ces microorganismes sont capables de fermenter de nombreuses substances glucidiques avec production d'acides acétique et propionique.

Ce *pouvoir glucidolytique* a été étudié sur huit souches. Pour cette étude, nous avons utilisé des tubes de Hall contenant le milieu de base, auquel nous avons ajouté, comme indicateur de réaction, 1 ml d'une solution à 0,02 % de bleu de bromothymol dans de l'alcool à 50°. Le glucide est apporté sous forme d'une solution concentrée stérilisée par filtration sur bougie L3. La lecture de la réaction est faite, au bout d'un séjour de dix jours à l'étuve, grâce au virage de l'indicateur coloré.

Nous avons, en outre, étudié le *rendement de la croissance* bactérienne des *Pr. pentosaceum*, *arabinosum* et *shermanii* dans le milieu de base contenant la source carbonée à étudier.

Résultats

A. Nous avons résumé le pouvoir glucidolytique des huit souches étudiées dans le tableau 9.

Nous pouvons remarquer une constance dans la fermentation du: glucose, lévulose, galactose, glycérine, mannose (ce qui les rapproche des *Corynebacterium*). Le dulcitol et l'inuline ne sont jamais fermentés. Il semble que ce pouvoir de fermentation des sucres soit assez constant pour que l'on puisse établir une clé de détermination (schéma 1).

B. Les résultats résumés dans les tableaux 10, 11, 12 montrent l'incontestable valeur du glucose et du lactate de sodium comme source carbonée.

TABLEAU 9

	PENTOSACEUM	RUBRUM	TECHNICUM	JENSENII	ARABINOSUM	THOENII	SHERMANII	FREUDENREICHII
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lévulose	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérine	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	—	—
Lactose	+	+	+	+	—	—	—	—
Rhamnose	+	—	—	—	—	—	—	—
Arabinose	+	+	+	—	+	—	+	—
Maltose	+	+	+	+	+	+	—	—
Mannitol	+	+	+	+	+	—	—	—
Sorbitol	+	—	—	—	+	+	—	+
Raffinose	+	+	+	+	+	—	—	—
Xylose	+	—	—	±	—	—	—	±
Amidon	+	—	+	—	+	—	—	+
Dextrine	+	—	+	—	—	—	—	—
Inuline	—	—	—	—	—	—	—	—
Dulcitol	—	—	—	—	—	—	—	—
A. lactique	+	+	+	+	+	+	+	+
A. pyruvique	+	+	+	+	+	+	+	+

Schéma I

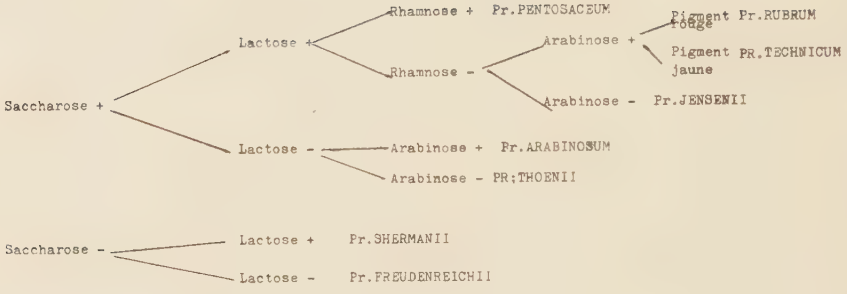


TABLEAU 10

Rendement de la croissance de Propionibactorium pentosaceum *aux dépens de différentes sources carbonées*

	CONCENTRATION G PAR LITRE	CROISSANCE TOTALE (unités de densité)	RENDEMENT
Glucose.	2	60	30
Lactose.	»	55	27,5
Maltose.	»	40	20
Mannose.	»	35	17,5
Saccharose.	»	40	20
Lactate Na.	»	65	32,5

TABLEAU 11

Rendement de la croissance de Propionibacterium arabinosum *aux dépense de différentes sources carbonées*

	CONCENTRATION G PAR LITRE	CROISSANCE TOTALE (unités de densité)	RENDEMENT
Glucose.	2	70	35
Lactose.	»	50	25
Maltose.	»	35	17,5
Mannose.	»	35	17,5
Saccharose.	»	45	22,5
Lactate Na.	»	65	32,5

TABLEAU 12

Rendement de la croissance de Propionibacterium shermanii *aux dépense de différentes sources carbonées*

	CONCENTRATION G PAR LITRE	CROISSANCE TOTALE (unités de densité)	RENDEMENT
Glucose.	2	64	32
Lactose.	»	58	29
Maltose.	»	42	21
Mannose.	»	38	19
Saccharose.	»	40	20
Lactate Na.	»	60	30

EFFET DU GLUCOSE SUR LA CROISSANCE DES *PROPIONIBACTERIUM*

Les résultats précédents montrèrent que le glucose est le sucre le plus facilement utilisé par les *Propionibacterium*. A une concentration de 0.20 g %, son effet sur la croissance est optimum.

Mais il est possible que l'efficacité particulière du glucose sur la croissance ne soit pas due uniquement à sa valeur en tant que source carbonée.

Nous avons remarqué, en effet, que dans des milieux synthétiques où les sels ammoniacaux constituaient la source azotée, l'influence du glucose sur la croissance était très différente selon que cet hexose avait été ajouté au milieu de culture avant ou après son autoclavage. La présence du glucose pendant l'autoclavage du milieu conduisait à un effet maximum sur la croissance.

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que le milieu contenant le glucose subit pendant l'autoclavage une évolution qui le conduit à posséder d'hypothétiques facteurs de croissance.

Il est beaucoup plus vraisemblable que l'effet de l'autoclavage du milieu glucosé résulte d'une variation du potentiel d'oxydo-réduction.

Nous savons, en effet, que dans ces conditions, une partie du glucose se transforme en réductone ou diénol

de l'acide tartronique (Von Euler et Martius). La présence de réductone dans le milieu de culture diminue le potentiel d'oxydo-réduction et permet une croissance plus facile des bactéries anaérobies.

Les *Propionibacterium* sont des espèces microaérophiles et vivant avec prédilection dans les milieux anaérobies. Il n'est donc pas surprenant que la diminution du potentiel d'oxydo-réduction du milieu favorise leur croissance.

Conclusions

Les *Propionibacterium* sont des microorganismes hétérotrophes et chimio-organotrophes.

Leurs besoins nutritifs sont complexes et leur pouvoir de synthèse limité. Ils exigent des facteurs de croissance qui sont contenus dans l'extrait de levure et qui ne sont pas remplaçables par un mélange de vitamines du groupe B.

En présence de ces facteurs de croissance, ils peuvent utiliser les sels ammoniacaux et tout particulièrement le phosphate et l'acétate d'ammonium. Mais la source azotée la plus intéressante est l'hydrolysat enzymatique de caséine. Les acides aminés représentent donc une source azotée supérieure aux sources minérales.

Les sources carbonées les plus intéressantes sont le glucose et le lactate de sodium. L'efficacité du glucose, lorsqu'il est ajouté au milieu avant l'autoclavage, doit être signalée.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDES
SUR LA FERMENTATION ACÉTO-PROPIONIQUE

ÉTUDES
SUR LA FERMENTATION ACÉTO-PROPIONIQUE

Les processus fermentaires comprennent toute une série de réactions de signification biologique variable, mais pendant lesquelles la molécule glucidique est dégradée. Au cours de certaines de ces réactions l'énergie est rendue utilisable et son transfert est assuré par le système ADP-ATP.

Jusqu'au stade acide pyruvique, des réactions identiques sont mises en jeu dans les métabolismes glucidiques aérobie ou anaérobie. Le processus fermentaire diffèrera ensuite suivant la nature de l'accepteur terminal d'hydrogène.

Les produits terminaux des fermentations bactériennes sont toujours complexes et dépendent du milieu de culture, du substrat fermentescible et surtout de l'espèce microbienne en cause. Mais pour un substrat déterminé, la nature des produits de dégradation de la molécule fermentescible par une espèce bactérienne donnée est constante. C'est précisément ce que l'on appelle le *type fermentaire* de l'espèce.

La diversité des produits de clivage complique souvent l'étude des fermentations bactériennes, cependant les substances susceptibles d'être décelées dans les filtrats de

culture en fin de fermentation peuvent se ramener à six groupes essentiels :

— Les substances à fonction alcool, aldehyde ou cétone;

— L'acétyl-méthyl-carbinol ou le 2-3 butylène glycol;

— L'acide hydroxybutyrique;

— Les substances à fonction phénol;

— Les acides aliphatiques volatils de C1 à C6;

— Les acides fixes de fermentation: lactique, succinique, pyruvique.

Toute espèce bactérienne fermentaire produit *au moins un acide volatil de fermentation.* Ce sont la nature et la proportion relative de ces acides volatils qui caractérisent surtout le type fermentaire.

Nous donnons dans le tableau 13 les principaux types fermentaires rencontrés en microbiologie. On y verra la place et l'importance de la fermentation propionique.

Tableau 13

Fermentation	acétique	1,10 %
»	formo-*propionique*	0,39
»	acéto-formique	5,10
»	acéto-*propionique*	3,90
»	acéto-butyrique	3,90
»	acéto-lactique	1,10
»	acéto-valérianique	1,45
»	butyro-valérianique	0,39
»	formo-*propiono*-lactique	7,80
»	formo-succino-lactique	6,60
»	formo-acéto-lactique	2,50
»	formo-valéro-lactique	1,10
»	formo-acéto-butyrique	0,39
»	formo-acéto-*propionique*	0,39
»	formo-butyro-valérianique	0,39
»	acéto-butyro-lactique	31,00
»	acéto-butyro-valérianique	8,10
»	acéto-valéro-lactique	7,80
»	acéto-capro-lactique	3,90
»	acéto-*propiono*-valérianique	2,20
»	acéto-butyro-succinique	2,20
»	acéto-*propiono*-lactique	2,20
»	*propiono*-valéro-lactique	1,10
»	*propiono*-succino-lactique	1,10
»	*propiono*-valéro-succinique	0,39
»	butyro-*propiono*-lactique	2,20
»	formo-acéto-*propiono*-lactique	1,45
»	acéto-*propiono*-butyro-lactique	0,39
»	*propiono*-valéro-capro-lactique	0,39
»	butyro-acéto-valéro-lactique	0,39

TYPE RESPIRATOIRE CHEZ LES *PROPIONIBACTERIUM*

Détermination du type respiratoire

Il représente la valeur limite du potentiel Redox nécessaire pour permettre la multiplication microbienne.

Il est en corrélation avec la présence dans le corps microbien de tels ou tels systèmes enzymatiques.

On le détermine par ensemencement du microorganisme en gélose profonde. Cette technique consiste à inoculer l'espèce microbienne dont on veut déterminer le type respiratoire dans toute la hauteur d'un tube contenant de la gélose nutritive glucosée préalablement désaérée par un passage de trente minutes au bain-marie bouillant. Après une incubation convenable, la répartition des colonies dans le milieu nutritif, leur dispersion ou leur concentration à telle ou telle hauteur, permet de définir leur type respiratoire.

Parmi les anaérobies, certains sont particulièrement sensibles au pouvoir bactériostatique de l'oxygène : ce sont les microaérophobes ou anaérobies stricts, d'autres le sont moins, d'autres tolèrent ou même utilisent une tension faible d'oxygène : ce sont les microaérophiles. D'autres, enfin, vivent entre deux limites très étroites de concentration d'oxygène: c'est la zone critique. D'autres, enfin, peuvent vivre sous plusieurs régimes différents de tension d'oxygène: c'est la croissance en zone alternante.

Signification du type respiratoire

Le mécanisme de ces divers modes de croissance s'explique aisément par la mesure des niveaux d'oxydo-réduction existant dans une gélose profonde régénérée. En employant: le bleu de méthylène (rh = 14), le tétrasulfoindigotine (rh = 12,5), le bleu de Nil (rh = 9,2), le violet de crésyle (rh = 8) et la disulfoindigotine (rh = 5,4), on peut mesurer le potentiel Redox des différents niveaux de la gélose profonde, après désaération de celle-ci, recoagulation dans l'eau froide et reoxydation spontanée à l'air.

On constate alors que la majorité des souches de *Propionibacterium* poussent à l'isolement dans des limites de rh comprises entre 12 et 14 (microaérophilie). *Pr. shermanii* et *freudenreichii*, considérés comme anaérobies stricts, sont, en fait, des espèces microaérophiles.

Ces types respiratoires correspondent à la présence ou à l'absence dans les corps microbiens d'un des systèmes enzymatiques suivants : deshydrase, cytochromes, cytochromes-oxydase, substances à activité per-oxydasique. Les anaérobies stricts sont des bactéries ne possédant pratiquement que des deshydrases et qui sont dépourvus d'hématine.

Le problème de la catalase chez les *Propionibacterium*

Depuis les travaux classiques de Mac Leod et de Gordon (1922), puis de Avery et Morgan, on sait que H_2O_2 se forme par transfert de l'hydrogène ou des élec-

trons à l'oxygène. L'accumulation de cette substance dans les cellules ou dans le milieu produirait une action inhibitrice ou toxique sur la plupart des microorganismes si la cellule ne disposait de moyens qui permettent de combattre cette action. Les composés hématiniques, tels que les cytochromes, exercent en général le pouvoir de décomposer les péroxydes. Néanmoins, l'action la plus nette et sans doute la plus importante est celle de la catalase. Cet enzyme contient l'Hème comme groupement prosthétique (la protohématine est douée en soi d'un pouvoir catalasique assez faible, mais sa combinaison avec une protéine conduit à des composés dont l'activité est très élevée).

Chance (1951) a montré que la catalase exerce une action peroxydasique qui peut se schématiser par les équations :

$$1^{\circ}\ Fe — OH + H_2O_2 \longrightarrow FeO — OH + H_2O$$

$$2^{\circ}\ FeO — OH + H_2O_2 \longrightarrow Fe — OH + H_2O + O_2$$

Dans la réaction n° 1, H_2O_2 réagit avec un des groupements FeOH pour former le complexe Fe — O — OH, un des groupes OH du peroxyde acceptant un atome d'hydrogène pour former de l'eau. Le complexe catalase-peroxyde ainsi formé peut à son tour agir comme une peroxydase avec une autre molécule de H_2O_2; il peut aussi réagir avec un substrat organique du type éthanol dans une réaction peroxydasique du type :

$$FeO — OH + CH_3CH_2OH \longrightarrow Fe — OH + CH_3CHO + H_2O$$

Lorsqu'une proportion élevée de H_2O_2 se forme, le peroxyde agit lui-même comme donateur d'hydrogène, il est réduit; le complexe Fe — O — OH étant oxydé avec réformation de FeO — OH et libération d'oxygène. La composition peroxydasique peut être considérée comme un moyen suffisant de prévenir l'accumulation de H_2O_2 jusqu'à atteindre des concentrations toxiques. Si bien que, chez les bactéries catalases négative, H_2O_2 s'accumule lorsque les microorganismes sont placés dans des conditions aérobies et la toxité intervient.

Les bactéries anaérobies sont catalase négative. Cependant, certaines espèces considérées comme des anaérobies possèdent une catalase, parmi celles-ci *Propionibacterium freudenreichii* et *Pr. shermanii* (les autres espèces du genre sont microaérophiles et bien entendu catalase positive).

Remarquons tout d'abord que les *Propionibacterium* ne sont pas seuls à présenter cette anomalie: d'autres groupes anaérobies comprennent également des espèces catalase positive, parmi ceux-ci les *Corynebacterium*, des *Bifidibacterium* et des *Actinobacterium* (*C. avidum*, *C. liquefaciens*, *A. bodeli*) (Prévot). C'est donc une raison supplémentaire de rapprocher ces trois genres. Soulignons cependant que contrairement au genre *Propionibacterium* dont les espèces anaérobies possèdent spontanément une catalase, cet enzyme n'apparaît dans les groupes voisins qu'après repiquage de certaines souches.

Étude sur la catalase des *Propionibacterium*

A. *Lieu de formation*

Nous avons repris pour cette étude le protocole expérimental utilisé par Prévot.

Les microorganismes sont cultivés sur milieu protéolysat - extrait de levure glucosé en tube de Yvan Hall. Au bout de 24 à 48 heures d'incubation et lorsque la croissance est satisfaisante, on centrifuge la culture qui est lavée plusieurs fois à l'eau physiologique. On recueille séparément :

— le liquide surnageant,
— les liquides de lavage,
— le culot microbien.

Sur chacune de ces parties l'épreuve de la catalase est réalisée en additionnant un prélèvement convenable de quelques gouttes d'une solution de H_2O_2.

On constate alors que le liquide surnageant est fortement catalase positive même après filtration sur L3: que les liquides de lavage sont de plus en plus faiblement catalase positif; que les culots bactériens, enfin, remis en suspension dans l'eau physiologique, sont fortement catalase positif.

Nous avons suivi la formation de la catalase chez *Pr. shermanii*. L'enzyme était recherché aux différents temps de la croissance microbienne, dans le culot de centrifugation ainsi que dans le filtrat de culture après filtration sur L3.

On remarque nettement l'apparition de l'enzyme dans le filtrat, au moment de la phase exponentielle de croissance. Au même temps, l'enzyme peut être mis en évidence dans les corps microbiens lavés.

La catalase des *Propionibacterium* est donc un *endoenzyme* diffusant dans le milieu de culture pendant la phase active de croissance du microorganisme. Il en est de même, rappelons-le, pour la catalase des *Corynebacterium* et des *Actinobacterium*.

B. *Signification de l'activité catalasique*

Pour en discuter, il est nécessaire de remonter à l'expérimentation de PRÉVOT dont nous parlons ci-dessus. Les six souches catalase positive qu'il a décelées parmi les 33 espèces anaérobies expérimentées, ne se sont pas montré catalase positive d'emblée.

Au premier examen effectué après repiquage à partir de souches lyophilisées, tous les essais furent négatifs. Au deuxième repiquage, une seule souche était devenue positive, trois nouvelles au troisième repiquage et enfin deux dernières au quatrième repiquage.

L'apparition de la catalase s'accompagne de l'évolution du type respiratoire qui tend vers la microaérophilie. Ce phénomène « d'aérobisation » peut être interprété comme une mutation; elle apparaît progressivement, après un certain nombre de repiquages, dans les conditions du tube de Hall, milieu dans lequel l'anaérobiose est peu poussée.

Il existe donc un parallélisme entre l'apparition de la catalase et l'évolution du type respiratoire. Chez les

Propionibacterium, l'aérobisation est déjà installée et toutes les espèces sont microaérophiles, ce qui justifie amplement l'apparition d'enzymes hématiniques dans leurs cellules.

Chez les *Corynebacterium* et chez les *Actinobacterium*, cette apparition de catalase ne se fait que par repiquages successifs. Il existe donc entre ces différents groupes une différence de degré dans leurs possibilités d'évolution.

Remarquons cependant que ce phénomène d'aérobisation se produit quasi-uniquement dans les groupes *Bifidibacterium*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Actinobacterium*.

Le tableau 14 donne dans ces groupes les possibilités d'évolution du type respiratoire pour les différentes espèces. (L'évolution vers la microaérophilie ou l'anaérobiose facultative s'accompagnant de la production de catalase.)

ANAÉROBIOSE STRICTE	MICROAÉROPHILIE	ANAÉROBIOSE FACULTATIVE
Bifidibacterium :		
B. birdum ——→		——→
B. appendicitis		
B. constellatum ——→		——→
B. intestinalis		
B. cornutum		
B. bifurcatum		
Corynebacterium :		
C. diphteroides ——→		——→
C. avidum ——→		——→
	C. renale cuniculi	
C. parvum ——→		——→
C. lymphophilum		
	C. hepato dystrophicans	
C. anaerobium ——→		
C. granulosum ——→		
C. liquefaciens ——→		
	C. pyogenes bovis	
	C. acnes	
Propionibacterium :	*P. pentosaceum*	
	P. arabinosum	——→
	P. technicum	
	P. raffinosaceum	
	P. shermani	
	P. freundenreichi	
Actinobacterium :		
A. israeli ——→		
A. meyeri		
A. abcessum		
A. liquefaciens ——→		
A. cellulitis		
A. propionici ——→		

Les flèches indiquent l'évolution possible du type respiratoire.

MÉCANISME
DE LA FERMENTATION ACÉTO-PROPIONIQUE

Les espèces du genre *Propionibacterium* fermentent certains hydrates de carbone, des polyalcools et certains acides organiques, tels que l'acide lactique, avec formation d'acides propionique, acétique et de CO_2, Fitz (1876) signale, le premier, ce type fermentaire, qu'il représentait par l'équation :

$$3\ CH_3\ CHOH\ COOH \longrightarrow 2\ CH_3\ CH_2\ COOH + CH_3\ COOH + CO_2$$

On pensait généralement (Van Niel, 1953) que l'acide propionique pouvait être obtenu par perte d'eau à partir du lactate :

$$CH_3\ CHOH\ COOH \xrightarrow[-\ H_2O]{} CH_2 = CH\ COOH$$

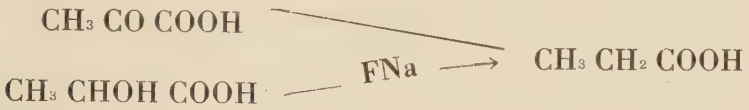
L'acide acrylique ainsi formé donnant par réduction l'acide propionique :

$$CH_2 = CH\ COOH \xrightarrow[+\ H_2]{} CH_3\ CH_2\ COOH$$

Mais il devint rapidement évident que si cette réaction pouvait être effectuée par *Clostridium propionicum* (Jones, 1952) (*a*), elle n'était pas le fait des bactéries propioniques, parfaitement incapables de réduire l'acide acrylique.

(a) On ignore d'ailleurs la place dans la classification de ce clostridium, germe très insuffisamment décrit et placé sous l'étiquette mal définie de *methano-bacterium*.

D'autre part, le fluorure inhibe la formation de propionate à partir du lactate, mais pas à partir du pyruvate :



Ce qui laisse à penser que l'acide lactique n'est pas la voie normale de destruction des sucres par les bactéries propioniques.

Passage vers l'acide succinique
Réaction de Wood-Werkmann

Un nouveau concept a été introduit en 1936 dans la physiologie microbienne lorsque Wood et Werkmann démontrèrent la possibilité d'une fixation de CO_2 par une bactérie hétérotrophe : *Propionibacterium pentosaceum.*

Ces deux auteurs observèrent que la teneur en carbone des produits de la fermentation du glycérol était plus élevée qu'il n'était théoriquement prévu. Ces constatations expérimentales ne pouvaient être acceptées que si l'on admettait une fixation de CO_2 pendant la fermentation. Cette fixation était observée seulement lorsque la fermentation était conduite en présence de carbonate. Les produits finaux étant *l'acide propionique et l'acide succinique.* L'acide propionique était formé presque uniquement lorsque la fermentation était conduite en l'absence de carbonate et avec des phosphates comme système tampon.

Ces résultats de Wood et Werkmann montraient que la fixation de CO_2 n'est pas limitée aux organismes

autotrophes (*a*) et qu'elle *implique la formation de succinate dans le processus de fixation.* Des preuves supplémentaires furent obtenues par Wood et ses collaborateurs, ainsi que par Carson et Ruden (1951), qui démontrèrent que le C marqué de CO_2 apparaissait dans les groupes carboxyl des acides succinique et propionique.

Wood et Werkmann ont tout d'abord avancé l'hypothèse que CO_2 se combine à l'acide pyruvique, dérivé lui-même du métabolisme glucidique, pour former un composé à 4 C, l'acide oxalo-acétique.

Cette fixation, qui est connue sous le nom de réaction de Wood-Werkmann, peut se schématiser comme suit :

$$\begin{array}{lll} & CH_3 - CO - COOH & \\ CO_2 + & \downarrow & \\ & COOH - CO - CH_2 - COOH \ldots\ldots\ldots & \text{oxalo-acétique} \\ H_2 + & \downarrow & \\ & COOH - CHOH - CH_2 - COOH \ldots\ldots & \text{malique} \\ H_2O + & \downarrow & \\ & COOH - CH = CH - COOH \ldots\ldots\ldots & \text{fumarique} \\ H_2 + & \downarrow & \\ & COOH - CH_2 - CH_2 - COOH \ldots\ldots\ldots & \text{succinique} \end{array}$$

La présence de deshydrogénases malique et succinique, de fumarase, de carboxylase oxalacétique, a été constatée chez les bactéries propioniques.

On doute, néanmoins, aujourd'hui, de la réalité de la carboxylation : acide pyruvique donnant acide oxalique. Il semble plus probable que le CO_2 se fixerait, sous

---

(*a*) Nous savons d'ailleurs aujourd'hui que la réaction de Wood-Werkmann dépasse le cadre des bactéries propioniques et représente un phénomène beaucoup plus général qui intéresse les bactéries hétérotrophes et même les cellules des animaux supérieurs : mammifères.

influence enzymatique avec *formation d'acide malique* (Ochoa, 1951).

Mais un nouveau développement fut apporté à l'étude du mécanisme de la fermentation propionique par des essais effectués avec *Veillonella* gazogènes, microcoque gram négatif anaérobie, qui fermente l'acide lactique avec production d'acides acétique, propionique, d'hydrogène et de CO_2. Ce même microorganisme décarboxyle l'acide succinique avec formation d'acides acétique et propionique (Johns, 1948). En est-il de même des *Propionibacterium* ?

Des études faites par Delwiche sur *P. pentosaceum* (1948) montrèrent que ce microorganisme décarboxyle lentement le succinate, mais à un degré qui permet cependant une formation décelable d'acide propionique. Cette décarboxylation avait d'ailleurs été suspectée par Shaww et Shermann (1924).

L'acide succinique est produit dans la réaction de fixation de CO_2, car il semble bien que, contrairement à d'autres microorganismes, les bactéries propioniques ne puissent le synthétiser par condensation de groupements acétyles à partir de complexe acétyl-coenzyme A.

Formation d'acide propionique et processus de fixation de CO_2 seraient donc deux phénomènes étroitement liés.

Nous n'avons aucune certitude sur le mécanisme de la décarboxylation de l'acide succinique, mais nous savons que les systèmes enzymatiques responsables agissent surtout en zone acide.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE LA FERMENTATION ACÉTO-PROPIONIQUE

Nos conceptions sur le mécanisme de la fermentation propionique ont donc évolué.

Pour Fitz et Van Niel, l'acide lactique était l'intermédiaire obligatoire, mais l'étude de la réaction de Wood et Werkmann a montré l'importance de l'acide succinique. Il est considéré actuellement comme le relai indispensable à la formation de l'acide propionique. Nous n'avons guère cependant de certitudes à ce sujet et ces résultats sont contestés, en particulier par Leaver et Wood.

La plupart des études précédentes ont été réalisées en utilisant la technique des bactéries non proliférantes, c'est-à-dire en se mettant dans des conditions qui n'ont rien à voir avec la physiologie normale des microorganismes.

Nous avons étudié, en suivant journellement l'apparition des produits du métabolisme microbien, le mécanisme de la fermentation acéto-propionique chez *Pr. pentosaceum*, *shermanii* et *arabinosum*, espérant ainsi obtenir quelques précisions sur le mécanisme fermentaire en milieu naturel.

Nous avons, d'autre part, étudié les produits du métabolisme au bout de dix jours à l'étuve sur *Pr. pentosaceum*, *rubrum*, *jensenii*, *thoenii*, *freudenreichii*.

Le milieu utilisé répond à la formule du bouillon VF amélioré selon la technique américaine déjà décrite.

Les techniques utilisées

L'identification des produits terminaux de la fermentation bactérienne dans les milieux de culture est d'une importance capitale, non seulement pour la détermination des espèces, mais aussi pour les études métaboliques. Certains de ces produits sont élaborés en minime quantité et dispersés dans un milieu très complexe. On est donc obligé d'avoir recours à des techniques spéciales.

Ces méthodes ont été codifiées par A. R. Prévot et son École et appliquées au diagnostic des bactéries anaérobies. Nous avons suivi ces méthodes en leur apportant quelques modifications de détail.

Les différentes souches ont été ensemencées dans des ballons de Jaubert et Gori contenant du bouillon de base glucosé à 10 %. Cette culture est centrifugée pour obtenir un liquide clair.

Identification des produits volatils neutres ou alcalins

On prélève 100 ml de culture claire à analyser, que l'on ajuste à pH 8,2 avec de la lessive de soude au 1/10. On ajoute environ 10 g de talc comme antimousse et l'on distille lentement pour obtenir 30 ml de distillat en une heure. Sur ce liquide, on recherche :

L'alcool : en ajoutant 1 ml de réactif au bichromate de potassium nitrique à 1 ml de distillat. Le tube est porté au bain-marie à 100°C : une coloration bleue indique la présence d'alcool.

Si la réaction est positive, nous rechercherons *l'éthanol* en ajoutant, à 2 ml de distillat, quatre gouttes de lessive de soude, puis du réactif de Lugol, jusqu'à coloration jaune-brun, qu'on fait disparaître par une goutte de lessive de soude; on refroidit. La présence d'éthanol se traduit par la formation d'iodoforme que l'on reconnaît à son odeur, puis à la formation lente de cristaux hexagonaux.

Quand la réaction de l'éthanol a été négative, après une réaction initiale positive, il faut penser à ses homologues supérieurs : propanol, butanol, etc... Dans ce cas, on reprend 2 ml du distillat alcalin que l'on oxyde à chaud par le mélange de Johnson :

Solution de bichromate.....	3 N
Acide sulfurique.....	10 N

Le produit de cette oxydation est ensuite entraîné à la vapeur d'eau. Au cours de cette opération, les alcools primaires ont été oxydés en acides correspondants, et les alcools secondaires en cétones. L'éthanol subit une oxydation imparfaite, et outre l'acide acétique, la portion entraînée contient de l'acétaldéhyde caractérisée par le point de fusion (139°C) de son composé d'addition avec la diméthylhydrorésorcine (dimedon), réactif spécifique des aldéhydes.

Le méthanol donne de l'acide formique.

Le propanol donne de l'acide n-propionique.

Le butanol donne de l'acide n-butyrique.

L'isopropanol donne de l'acétone.

Les acides sont ensuite caractérisés par la méthode chromatophique décrite plus loin.

Les aldéhydes, grâce à leur haut pouvoir réducteur. Tout d'abord la réaction du réactif de Schiff :

Fushine	1 g
Eau distillée bouillante	200 ml
agiter et filtrer à 50°C	
Acide chlorhydrique pur	20 ml
Bisulfite de soude anhydre	2 g
attendre 24 heures que la solution se décolore.	

Cette réaction n'est pas spécifique, mais elle est très sensible et, si elle est négative, on peut affirmer qu'il n'y a pas d'aldéhyde. Si elle est positive, il faudra vérifier par la réduction à froid de la liqueur de Felhing qui donne un précipité rouge d'oxydule de cuivre. Le plus fréquent des aldéhydes de fermentation est l'acétaldéhyde que l'on caractérise par la réaction de Rimini: en présence d'une solution fraîche de nitroprussiate de sodium, l'acétaldéhyde agit sur la diméthylamine en donnant une coloration bleue.

Les cétones : Elles donnent un précipité blanc-jaunâtre avec le réactif de Nessler :

Chlorure mercurique	13,55 g
Eau distillée	100 ml
Iodure de potassium	36 g

Mais surtout le réactif de Deniges, qui donne un précipité blanc avec *l'acétone* :

Oxyde de mercure jaune ou rouge	50 g
Acide sulfurique pur	200 ml
Eau distillée	1 000 ml

Les amines volatiles : par l'obtention d'une coloration jaune avec le réactif de Nessler.

Identification des acides de fermentation

Les méthodes de recherches diffèrent selon que l'on veut caractériser les acides volatils ou les acides fixes.

I. *Acides volatils*

Il s'agit des acides aliphatiques de C1 à C6. Le seul que l'on trouve à l'état pur est l'acide acétique. Pour les autres, on les trouve associés deux par deux, ou trois par trois. Pour cette recherche dans le même ballon que précédemment, le résidu de la distillation acide est amené à pH 3 par addition d'une solution d'acide tartrique à 40 % (acide que l'on ne risque pas de retrouver comme acide de transformation du germe). La distillation est faite par entraînement à la vapeur d'eau pendant une heure et demie, de façon à recueillir environ 300 à 400 ml de distillat dans une éprouvette graduée contenant 10 ml de soude N/10 et quelques gouttes de rouge de crésol. Quand il y a virage de l'indicateur coloré, on ajoute dix autres ml de soude N/10 et ainsi jusqu'à persistance de l'alcalinité. Sur ce distillat, nous avons :

a) calculé *l'acidité volatile totale :* A une prise d'essai de 10 ml de distillat acide, on ajoute à la burette de l'acide sulfurique N/10 jusqu'à neutralisation. Par calcul, on déduit l'acidité volatile totale rapportée à un litre de bouillon de culture;

b) caractérisé ces acides volatiles : par la méthode chromatographique, plus rapide et plus précise que les autres. Le distillat acide neutralisé par la soude N/10 est concentré sous vide jusqu'à obtention d'environ 4 ml. On ajoute alors 0,7 g de permutite fraîchement régénérée. Après un contact de cinq minutes, on filtre sur coton de verre et on neutralise par quelques gouttes de morpholine N. A l'aide d'une micropipette, 5, 10, 20 ml sont déposés sur du papier Whatman n° 2. La chromatographie ascendante est réalisée à basse température avec le solvant suivant :

Butanol	180	ml
Cyclohéxane	180	ml
Propane diol	60	ml
Ammoniaque à 22°	4,2	ml
Morpholine	0,42	ml
Eau distillée	21	ml

La révélation se fera, après une migration de 12 heures, par pulvérisation d'une solution :

3/4 solution A,

1/4 solution B.

Solution A :

Orthocrésol-sulfone-phtaléine	0,2	g
Eau distillée	15	ml
NaOH N	0,3	ml

Solution B :

Véronal sodique	10	g
Eau distillée	100	ml
Alcool à 96°	150	ml

Les différents acides apparaissent en jaune sur un fond rouge-violacé et sont caractérisés grâce à des solutions témoins déposées sur le papier à chromatographie au début de l'expérimentation.

II. *Acides fixes*

Les acides fixes formés en culture ne sont pas nombreux. L'un, très fréquent, l'acide pyruvique, n'est qu'un produit intermédiaire du métabolisme. Un autre, également très fréquent, l'acide lactique, est un produit terminal de fermentation, comme le troisième, l'acide succinique, celui-ci très rare.

On les extrait tous les trois ensemble par l'éther: dans une ampoule à décantation, 100 ml de bouillon de culture sont acidifiés à pH 3 par de l'acide sulfurique à 1/10 et mis en contact avec de l'éther pendant 24 heures. La solution éthérée est décantée et évaporée. Le résidu est repris par de l'eau distillée et nous recherchons :

L'acide lactique : Dans un tube à essai, on met deux gouttes de résidu dans 2 ml d'acide sulfurique concentré et on porte deux minutes au bain-marie à 100°C. On refroidit sous courant d'eau. La présence d'acide lactique se traduit par l'apparition d'un anneau rouge par addition de deux à trois gouttes d'alcool gaiacolé à 5 %.

L'acide pyruvique donne une coloration bleue avec :

Solution aqueuse du résidu.....	1 ml
Acide acétique à 40 %.....	0,5 ml
Ammoniaque à 22° Baumé dilué au $\frac{1}{2}$.	1,5 ml

L'acide succinique par évaporation de quelques gouttes de résidu et d'ammoniaque. Le résidu d'évaporation est repris par quelques gouttes d'eau distillée. L'addition de quelques gouttes de perchlorure de fer à 10 % fait apparaître un précipité ocre-gélatineux en présence d'acide succinique.

Identification des phénols et des crésols

A 400 ml de culture, on ajoute un volume égal d'eau distillée et 5 ml d'acide sulfurique. On distille 600 ml. On alcalinise le distillat par de la soude à pH 9, puis on redistille 500 ml. Dans ce distillat se trouve la totalité de *l'indol* et du scatol, que l'on caractérise par le réactif d'Erlich :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde....	3,50 g
Alcool amylique.....	75 ml
après dissolution, on ajoute	
Acide chlorhydrique.....	25 ml

S'il apparaît un anneau rouge à la surface de séparation, il faut séparer les phénols. Pour cela on sature le résidu par un courant de CO_2, puis on redistille à nouveau jusqu'à siccité. Les *phénols* donnent une coloration bleue-

violacée avec le perchlorure de fer. Les *crésols* sont caractérisés par la réaction au formol :

Distillat.	1 ml
Acide acétique.	1 ml
Formol.	4 gouttes
Acide sulfurique.	1 ml

L'orthocrésol donne une coloration rose limpide.

Le métacrésol donne une coloration violette louche.

Le paracrésol donne une coloration verte.

Identification de l'acétylméthylcarbinol ou acétoine

Nous avons employé la méthode de Lemoigne, modifiée par Kluyver, Donker et Vissert'Hoff. A 100 ml de bouillon de culture, on ajoute 5 ml d'une solution de perchlorure de fer à 25 % et 10 g de talc comme anti-mousse. On distille doucement. Trois à 4 ml de distillat sont recueillis dans un tube contenant une solution d'hydroxylamine à 20 % pour fixer le diacétyle formé. On tamponne à l'acétate de sodium et on ajoute 5 gouttes de chlorure de nickel à 10 %. Le mélange est porté à l'ébullition deux minutes, puis refroidi brusquement dans la glace. L'apparition d'un précipité rouge traduit la présence d'acétoine.

Identification de l'acide B-oxybutyrique

Il se caractérise par son lipide, que l'on met en évidence par la technique de Lemoigne et Roukhelman. Il faut employer comme milieu de culture :

Saccharose	20 g
Peptone	2 g
Gélose	20 g
Bouillon de haricots	1 000 ml

On centrifuge après un séjour de dix jours à l'étuve. Le culot microbien est traité par de l'acide chlorhydrique à 20 % et maintenu trois minutes à 100°C. On refroidit et on centrifuge. La masse microbienne est lavée trois fois à l'alcool, une fois à l'éther, puis épuisée au chloroforme bouillant. La liqueur chloroformique filtrée est évaporée à sec. Il se forme un film de lipide hydroxybutyrique se présentant en pellicules translucides qui, par distillation, donnent des cristaux d'acide crotonique fondant à 72°C.

Dosage de l'ammoniaque

L'ammoniaque étant un produit obligatoire des fermentations anaérobies, et très fréquent des cultures aérobies, il ne s'agit plus de le caractériser, mais de le doser. Nous avons utilisé pour cela la méthode de Parnasse et Wagner. Dans l'appareil de Parnasse :

5 ml de bouillon de culture,

2 ml de lessive de soude à 30 %,

5 ml d'eau distillée.

L'entraînement est réalisé à la vapeur d'eau et l'ammoniaque dégagé est reçu dans un bécher contenant 10 ml d'acide sulfurique N/50 et du rouge de méthyl comme indicateur coloré. Après quinze minutes de distillation, l'excès d'acide sulfurique est neutralisé par de la

soude N/50. Après calcul, on déduit la quantité de NH_3 contenue dans un litre de bouillon de culture.

Résultats

Ils sont exprimés dans le graphique 5 et dans le tableau 15. Nous pouvons les résumer de la manière suivante :

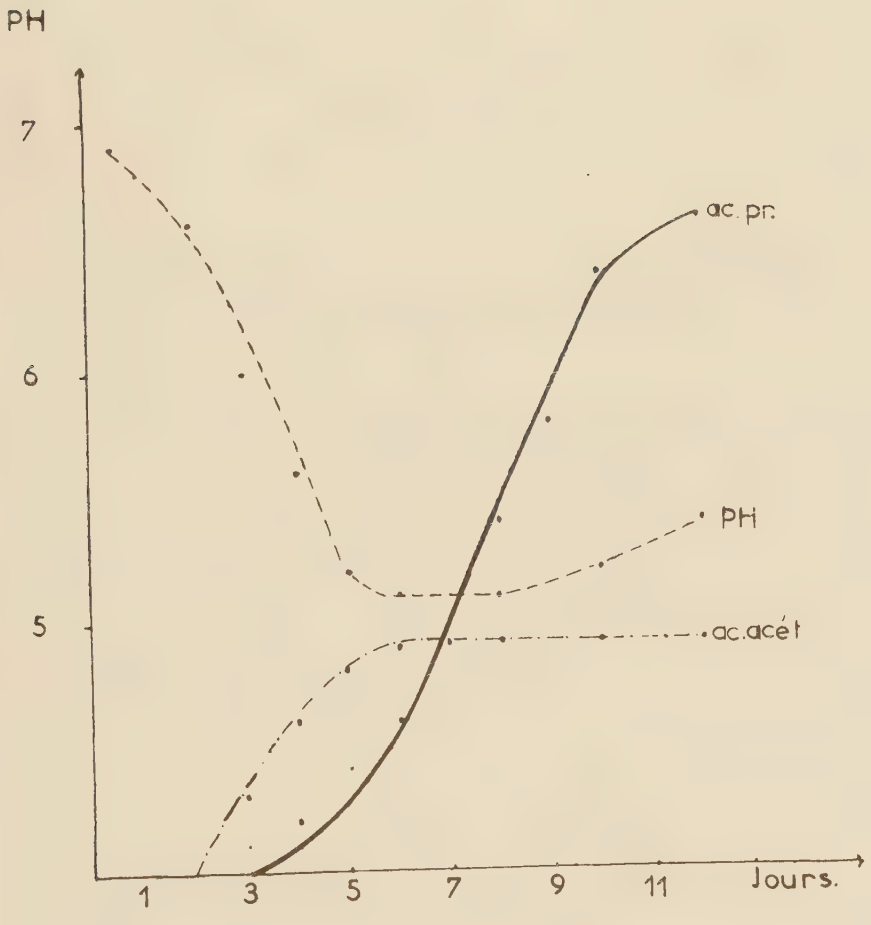
Dans les conditions expérimentales, l'utilisation du glucose entraîne une diminution rapide du pH, qui atteint, au bout de cinq à six jours de culture, des valeurs voisines de 4,5.

Le dosage de l'acidité volatile totale, ainsi que la caractérisation des acides de fermentation, montre que l'acide acétique est surtout produit au voisinage de la neutralité et que l'acide propionique apparaît lorsque le pH du milieu de fermentation est inférieur à 6,5. Le maximum de la formation est atteint pour des pH de l'ordre de 5,3; on atteint alors (vers le septième jour) le type fermentaire définitif :

$$\frac{\text{Acide propionique}}{\text{Acide acétique}} = \frac{3}{1}$$

L'acide succinique, que l'on peut déceler dans le milieu dès le troisième jour de culture, disparaît plus ou moins rapidement. Cette disparition coïncide avec la formation d'acide propionique.

Il semble donc que l'acide propionique soit formé à partir de l'acide succinique. La décarboxylation serait, selon l'hypothèse de Delwich, fonction du pH; l'optimum de cette réaction se situant à des pH voisins de 4,5.



GRAPHIQUE 5.

Evolution du pH et de l'acidité volatile chez *P. arabinosum*

CONCLUSIONS

Nous avons étudié, dans ce travail consacré aux *Propionibacterium*, les caractères bactériologiques et la physiologie générale de ce groupe.

Microorganismes chimioorganotrophes et hétérotrophes, leur croissance exige des milieux complexes. Des facteurs de croissance appartenant au groupe vitaminique B leur sont indispensables. La meilleure source azotée est constituée par des acides aminés et la meilleure source carbonée, par le glucose et le lactate de sodium.

Dans ces conditions de culture, le type fermentaire évolue constamment vers le rapport :

$$\frac{\text{Acide propionique}}{\text{Acide acétique}} = \frac{3}{1}$$

L'acide propionique dérive, semble-t-il, de l'acide succinique; la décarboxylation de ce dernier n'intervenant que pour des pH inférieurs à 6,5.

Actinomycétales typiques, les *Propionibacterium* sont bactériologiquement très voisins des *Corynebacterium* microaérophiles, dont ils ne se distinguent que par quelques caractères morphologiques.

Le Président de Thèse,

BOUISSET.

Vu : *Le Doyen,*

LAZORTHES.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Toulouse, le 16 mai 1962.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

Carson (S. F.), Ruben (S.). — CO_2 assimilation by propionic acid bacteria studie by the use of radio-active-carbon. *Proc. N. Atl. Acad. Sci. U.S.*, 26, 422-426, 1940.

Chaix (P.), Fromageot (Cl.). — Sur un activateur du métabolisme des bactéries propioniques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 18, 874, 1935.

Clifton (C. E.). — Introduction to Bacterial Physiology. Mc Graw. Hill. Book Company, 1957.

Delwiche (E. A.). — Mechanism of propionic acid fermentation by *Propionibacterium pentosaceum*. *J. Bactériol.*, 56, 811-820, 1948.

Fitz (A.). — Ueber die Gährung des glycerins. *Ber.*, 9, 1348, 1876.

Johns (A. T.). — The mechanism of propionic acid - fermentation by *Clostridium propionicum*. *J. Gen. Microbiol.*, 6, 123-127, 1952.

Knight. — Bacterial Nutrition. *His Majesty's Stationery Office*, Londres, 1936.

Laroux (P.). — Sur la nutrition azotée de *P. pentosaceum*. *Thèse es Sciences*, Lyon, 1937.

Leaver (F. W.), Wood (H. G.). — Evidence from fermentation of labeled substrates which is inconsistent with present concepts of the propionic acid fermentation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41, suppl. 1. 225-240, 1953.

Makarevich, Verkhovzeva et Lasnikova. — Synthèse de la vitamine B_2.

Mauron (I.), Wenner (V.). Egli (R.). — Nouveau test microbiologique pour les hydrolysats de protéines. Colloque sur les acides aminés. Lausanne, avril 1953. Masson, édit., Paris.

Monod (J.). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann et C^{ie}, édit., Paris, 1942.

Ochoa (S.). — Enzymatic mechanisms of carbon dioxid fixation in *J. B. Sumner and K. Myrbäck the « Enzymes »*, vol. 2, 929-1032. *Academic Press. Inc.*. New York, 1951.

Orla-Jensen (S.). — The lactic-acid Bacteria. Copenhague, 1919.

Orla-Jensen (S.), Otte (N. C.), Agnete, Snog, Kjaer. — Die Vitaminebedarf der Milchsaurebakterien. *Zentralbl. f. Bakt.*, II, 94, 434-447, 1936.

Pawełkiewicz et Bartosinski. — Synthèse de la vitamine B_{12}.

Prévot (A. R.). Thouvenot (H.). — *Ann. Institut Pasteur*, 83, 443-448, 1952.

Van Niel (C. B.). — The propionic acid bacteria. J. W. Boissevain, Haarlem, 1928.

VAN NIEL (C. B.). — Introductory remarks on the Comparative biochemistry of microorganisms. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41, suppl. 1, 11-38, 1953.

VON FREUDENREICH, ORLA-JENSEN (S.). — *Centralbl. f. Bakt.*, II, 17, 532, 1906.

WOOD (H. G.), WERKMANN (Ch.). — The utilization of CO_2 in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria. *Biochem. J.*, 30, 48-53, 1936.

WOOD (H. G.), ANDERSEN (A. A.). — Nutrition of the Propionic acid bacteria. *Jour. Bact.*, 36, 201, 1938.